



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR  
Faculdade de Ciências

**Biofuncionalização do algodão com L-Cisteína:  
estudo do efeito antibacteriano e dos mecanismos  
de acção contra *S. aureus* e *K. pneumoniae***

**Estela Sofia de Almeida Caldeira**

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em  
**Bioquímica**  
(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutora Isabel Cristina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia

**Covilhã, Junho de 2012**



## **Dedicatória**

Dedico este trabalho aos meus pais e ao meu irmão pelo seu apoio incondicional, pela confiança que sempre depositaram em mim, pela força e coragem que sempre me transmitiram, e por tudo o que fizeram para que conseguisse atingir mais esta meta. Sem eles não seria possível.



# Agradecimentos

Neste trabalho o agradecimento a todas as pessoas que directa ou indirectamente me ajudaram a tornar-lo possível é imprescindível, a eles o meu muito obrigada.

Primeiramente, quero agradecer à minha orientadora a Prof. Doutora Isabel Cristina Aguiar de Sousa e Silva Gouveia, pelo apoio, orientação, incentivo e disponibilidade demonstrados ao longo da realização deste trabalho.

Um especial agradecimento à Fundação para a Ciência e Tecnologia e ao Compete pelo financiamento disponibilizado através de projecto: PTDC/EBB-BIO/113671/2009 Skin2Tex, no qual esta dissertação se insere.

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Ana Palmeira de Oliveira, pela sua disponibilidade, ensinamentos e todo o interesse demonstrado para com este trabalho. Agradeço ainda ao Carlos Gaspar pela ajuda dispendida.

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Luiza Breitenfeld Granadeiro, pela ajuda e conhecimentos transmitidos ao longo do trabalho que sempre teve para comigo.

À Prof<sup>a</sup>. Doutora Filomena Augusta Almeida e Silva pelos ensinamentos, ajuda, disponibilidade, e tempo dispendidos comigo.

Ao departamento de Ciência e Tecnologia Têxtil, ao departamento de Química e ao Centro de Investigação em Ciências da Saúde pela cedência de instalações e equipamento. Agradeço ainda ao Sr. Machado pela ajuda prestada.

Um agradecimento especial à Daniela, pela sua preciosa ajuda ao longo deste trabalho. Também por ser, além de colega de trabalho, uma amiga que me apoiou e incentivou bastante. Foi bom poder trabalhar contigo.

Ao meu namorado, Rui Oliveira, pela paciência, apoio, incentivo, e ajuda indispensáveis nos momentos mais complicados.

Um muito obrigado a todos os meus colegas e amigos. Em especial para os amigos (especiais) que fiz nesta cidade, a Andréa, a Cleide, a Eunice, a Joana, o Paulo, o Renato, a Sandra, a Sara e a Sónia, a todos eles o meu muito obrigado; pelo apoio, amizade, e por serem a minha segunda família nesta terra que adoptei como minha.

Agradeço ainda à Diana, à Susana, à Ana e à Rita pela companhia, amizade e disponibilidade.



# Resumo

Nos últimos tempos a procura pelos produtos de origem natural tem vindo a aumentar e, como resultado, a procura por fibras têxteis naturais também tem aumentado. O Algodão é a fibra têxtil mais importante devido à sua versatilidade, que faz com que este seja a fibra têxtil com maior número de aplicações. A necessidade de utilizar tecidos com propriedades antimicrobianas surgiu devido à necessidade de os proteger contra o apodrecimento causado por microrganismos. De facto, o crescimento de microrganismos nos têxteis apresenta uma série de efeitos indesejados, não apenas nos próprios têxteis mas também em quem os utiliza. Por estes motivos, é necessário que o crescimento dos microrganismos nos têxteis, durante o seu uso e armazenamento, seja minimizado. Para se seleccionar um agente antimicrobiano é necessário ter em conta algumas condições: eficácia contra um amplo espectro de bactérias e fungos, durabilidade do acabamento, baixa toxicidade para o utilizador e ambiente, o método de incorporação e a capacidade de fixação, e devem ser de baixo custo.

O objectivo deste trabalho consiste na obtenção de um material têxtil de algodão funcionalizado com L-Cisteína (L-Cys) para obtenção de um efeito antibacteriano, com potencial aplicação em materiais têxteis biomédicos, geriátricos e pediátricos. Para tal, testou-se a capacidade de ligação da L-Cisteína às fibras de algodão, com funcionalização por esgotamento e impregnação, com posterior análise da possível acção anti-microbiana sobre *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*. Procedeu-se também à determinação da concentração mínima inibitória (MIC) do composto em causa para posterior comparação com a percentagem inibitória presente na fibra, e com a de outros biocidas já conhecidos. A inibição do crescimento das estirpes mencionadas foi verificada de acordo com a Norma JIS L 1902-2002. Efectuaram-se alguns ensaios de controlo da qualidade da fibra e do acabamento, nomeadamente ensaios de resistência ao rasgo e à lavagem. O ensaio de Ellman's nas amostras e análise elementar por Energia Dispersiva de Raios X (EDX) permitiu confirmar a presença da L-Cisteína nas fibras de algodão. Recorreu-se ainda à técnica da citometria de fluxo para determinar o mecanismo de acção do composto em estudo sobre as estirpes seleccionadas.

Os resultados obtidos neste trabalho revelaram que este processo confere bioactividade ao material tratado, traduzida através de efeito antibacteriano em bactérias Gram positivas e Gram negativas, avaliado pela norma JIS L 1902-2002, com efeito permanente comprovado através dos ensaios de solidez à lavagem realizados. Foi possível verificar ainda que o mecanismo de acção da L-Cys sobre as bactérias em estudo reside na ocorrência de alterações na actividade metabólica destas bactérias, sendo também visível alguma despolarização de membrana.

## Palavras-chave

Têxteis biomédicos, Algodão, L-Cisteína, Agentes antimicrobianos, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, Mecanismos de acção



## Abstract

Lately the demand for natural products has increased and as a result also the demand for natural fibers. Cotton fiber is the most important textile fiber because of its versatility, which makes this the textile fiber with a higher number of applications. The need for fabrics with antimicrobial properties arose from the need to protect fabrics against the rottenness caused by microorganisms. In fact, the growth of microorganisms in textiles has a number of undesirable effects, not only on textiles themselves, but also on who uses them. For these reasons it is necessary to minimize the growth of microorganisms in the textile during use and storage. To select an antimicrobial agent its necessary to make allowance of the conditions: effectiveness against a broad spectrum of bacteria and fungi, durability of the finishing treatment, low toxicity for the user and environment, the method of incorporation and fixation ability, and should be low cost.

The aim of this work is to obtain a cotton textile material functionalized with L-Cysteine (L-Cys) to achieve an anti-microbial effect with potential application in biomedical, geriatric and pediatric textiles. For this purpose, the binding capacity of L-Cysteine on cotton fibers was tested, with functionalization by exhaustion and impregnation processes, and with subsequent analysis of possible anti-microbial action on *Staphylococcus aureus* and *Klebsiella pneumoniae*. It was also carried out the determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of the compound for comparison with the inhibitory percentage present in the fiber, and further with other known biocides. Growth inhibition of mentioned bacteria was observed in accordance with standard JIS L 1902-2002. Some quality control tests of fiber and finishing were performed, including tests of resistance to tearing and washing, Ellman's assay in the samples and elemental analysis by Energy Dispersive X-ray (EDX) were performed to check the presence of L-Cysteine on cotton fibres. It was also used the technique of flow cytometry to determine the mechanism of action of L-Cys on the selected strains.

The results of this study reveal that this process confers bioactivity to the treated fabric, represented by antibacterial effect on Gram positive and negative bacteria, measured by JIS L 1902-2002, with permanent effect demonstrated through tests of laundry fastness. It was also observed that the mechanism of action of L-Cys on the bacteria in question is the occurrence of changes in metabolic activity and is also visible a membrane depolarization of these bacteria.

## Keywords

Antimicrobial textiles, Cotton, L-Cysteine, Antimicrobial agents, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, Mechanisms of action

# Índice

Capítulo 1 - Introdução	1
1.1 Fibras Têxteis	1
1.1.1 Algodão	2
1.1.1.1 Composição química do algodão	3
1.1.1.2 Propriedades estruturais do algodão	4
1.1.1.3 Propriedades químicas	5
1.1.1.4 Biodegradação	6
1.1.1.5 Propriedades físicas do algodão	7
1.1.1.6 Aplicações	8
1.2 Têxteis antimicrobianos	9
1.2.1 Acabamentos antimicrobianos	11
1.2.2 Compostos antimicrobianos	12
1.2.2.1 Compostos antimicrobianos sintéticos	14
a) Metais e Sais metálicos	14
b) Compostos quaternários de amónio	14
c) PHMB (polihexametileno de biguanidina)	15
d) Triclosano (compostos fenólicos)	15
e) N-Halamina	16
f) Peróxidos regeneráveis	16
g) Corantes sintéticos	17
1.2.2.2 Compostos antimicrobianos naturais	17
a) Polissacáridos Naturais (alginato, dextrano, ácido hialurónico)	17
b) Quitosano	18
c) Corantes naturais	18
d) Derivados de plantas (aloé vera, extractos de óleos essenciais de plantas)	19
e) Mel	19
f) Aminoácidos (Sericina, Cisteína)	20
1.3 Microrganismos	20
1.4 Mecanismos de acção dos agentes antimicrobianos	23
1.5 Cisteína	25
1.6 Testes antimicrobianos	27
1.6.1 Teste de difusão em Agar	27
1.6.2 Teste quantitativo (ensaio em suspensão)	28
1.7 Testes de avaliação de actividade	29
1.7.1 Citometria de fluxo	30

1.7.1.1 Fluorocromos	31
Capítulo 2 - Objectivos	35
Capítulo 3 - Materiais e Métodos	37
3.1 Materiais	38
3.2 Métodos	40
3.2.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) para a L-Cisteína	40
a) Método de microdiluição em caldo	40
b) Método de macrodiluição	41
3.2.2 Funcionalização do Algodão	41
a) Activação da superfície do algodão	41
b) Biofuncionalização de materiais têxteis por esgotamento	42
c) Biofuncionalização de materiais têxteis por impregnação	43
3.2.3 Avaliação da eficácia da funcionalização	43
a) Ensaio do reagente de Ellman (determinação qualitativa dos grupos tiol livres presentes nas amostras)	43
b) Análise por EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)	44
3.2.4 Ensaios de controlo de qualidade das amostras funcionalizadas	45
a) Ensaio de resistência ao rasgo	45
b) Ensaio da solidez à lavagem	45
3.2.5 Avaliação do efeito antimicrobiano	46
a) Teste de difusão em Agar	46
b) Teste quantitativo	47
3.2.6 Estudo do mecanismo de acção da L-Cisteína para <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i>	48
a) Curvas de morte para a L-Cisteína	48
b) Citometria de Fluxo:	49
I. Determinação dos controlos para cada marcador	50
II. Avaliação da actividade antimicrobiana de um composto por citometria de fluxo - ensaios em suspensão	52
III. Avaliação da actividade antimicrobiana de um composto por citometria de fluxo - ensaios com têxtil	53
Capítulo 4 - Resultados e discussão	55
4.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) para a L-Cisteína	55
4.2 Avaliação da eficácia da funcionalização de materiais têxteis	58
a) Ensaio do reagente de Ellman (determinação quantitativa dos grupos tiol livres presentes nas amostras)	58
b) Análise elementar por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)	59
4.3 Ensaios de controlo de qualidade das amostras funcionalizadas	60
a) Ensaio de resistência à rotura	60

4.4 Avaliação do efeito antimicrobiano	61
a) Teste de difusão em Agar	61
b) Teste quantitativo	62
4.5 Estudo do mecanismo de acção da L-Cisteína para <i>S. aureus</i> e <i>K. pneumoniae</i>	71
a) Curvas de morte para a L-Cisteína	71
b) Citometria de Fluxo:	72
I. Determinação dos controlos para cada marcador	72
II. Avaliação da actividade antimicrobiana de um composto por citometria de fluxo - ensaios usando L-Cys em solução	75
III. Avaliação da actividade antimicrobiana de um composto por citometria de fluxo - ensaios usando os extractos das amostras têxteis	77
Capítulo 5 - Conclusão	81
Capítulo 6 - Perspectivas Futuras	83
Capítulo 7 - Bibliografia	85



# Lista de Figuras

Figura 1.1 - As reacções de agentes químicos com a celulose são quase exclusivamente com os grupos 2, 3 e 6 OH, grupos esses que não estão envolvidos na formação de polímeros lineares que consistem em unidades D-anidroglicose unidas por ligações b-1,4 (adaptado de Lewin M. *et al* 1998)

Figura 1.2 - O agente antimicrobiano está incorporado nas fibras (a), aplicado na superfície da fibra (b) e ligado quimicamente as fibras (c) (adaptado de Ristić T. *et al*, 2011)

Figura 1.3 - Imagens de microscopia das estirpes (A) *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e (C) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) diferenciadas através da coloração de gram; e imagens SEM (x10000) das estirpes (B) *Klebsiella pneumoniae* e (D) *Staphylococcus aureus* (A e C fotografia do autor; B e D adaptado de: Gomes A.P. *et al*, 2010)

Figura 1.4 - Efeito biocida/biostático dos agentes antimicrobianos na curva de crescimento de microrganismos (adaptado de: Ristić T. *et al*, 2011)

Figura 1.5 - Possíveis locais de acção dos agentes antimicrobianos (Cloete T.E., 2003)

Figura 1.6 - reacção da formação de uma molécula de cistina através da junção de duas moléculas de Cisteína por ligações dissulfureto (adaptado de: Nelson L. D. *et al*, 2008)

Figura 1.7 - Esquema representativo dos diferentes graus de viabilidade e vitalidade celular (adaptado de: Díaz M. *et al*, 2009)

Figura 1.8 - Fluorocromos, locais alvo na célula e funções a identificar pelos fluorocromos (Díaz M. *et al*, 2010)

Figura 4.1 - Resultados dos ensaios de Ellman's efectuados a amostras de algodão funcionalizadas com L-Cys a (80°C/60min), o ensaio foi realizado a 80°C durante 45min. (A) amostra controlo; (B) amostra funcionalizada com 3% de L-Cys; (C) amostra funcionalizada com 5% de L-Cys; (D) amostra funcionalizada com 7% de L-Cys (fotografia do autor)

Figura 4.2 - Analise EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy) das amostras de algodão funcionalizadas com L-Cisteína (Legenda: — amostra controlo; — amostra funcionalizada)

Figura 4.3 - Resultados obtidos nos ensaios de difusão em Agar, com diferentes concentrações, para ambas as estirpes

Figura 4.4 - Curva de morte para o valor do MIC da L-Cisteína para a *Klebsiella pneumoniae* (controlo: apenas meio e bactéria; branco: bactéria e DTT em quantidade referente ao valor do MIC)

Figura 4.5 - Curva de morte para o valor do MIC da L-Cisteína para a *Staphylococcus aureus* (controle: apenas meio e bactéria; branco: bactéria e DTT em quantidade referente ao valor do MIC)

Figura 4.6 - Histogramas dos controles definidos para cada fluorocromo (— controle positivo; — controle negativo). Histogramas (A), (B) e (C) controles positivo e negativo de cada fluorocromo para a *K. pneumoniae*; (D), (E) e (F) controles positivo e negativo de cada fluorocromo para a *S. aureus*

Figura 4.7 - Histogramas dos resultados dos ensaios de citometria em suspensão, para cada fluorocromo (— controle; — MIC). Histogramas (A), (B) e (C) resultados de cada fluorocromo para a *K. pneumoniae*; (D), (E) e (F) resultados de cada fluorocromo para a *S. aureus*

Figura 4.8 - Histogramas dos resultados dos ensaios de citometria para células bacterianas retiradas de amostras têxteis, para cada fluorocromo (— controle; — 3,5% para Kp e 6% para Sa; — 6% para Kp e 8,5% para Sa). Histogramas (A), (B) e (C) resultados de cada fluorocromo para a *K. pneumoniae*; (D), (E) e (F) resultados de cada fluorocromo para a *S. aureus*



# Lista de Tabelas

Tabela 1.1 - Composição típica das fibras de algodão (adaptado de Lewin M. *et al*, 1998)

Tabela 3.1 - Reagentes utilizados durante o trabalho experimental

Tabela 3.2 - Equipamento utilizado no decorrer deste trabalho experimental

Tabela 3.3 - Combinações de condições experimentais de funcionalização por esgotamento

Tabela 3.4 - Condições necessárias para a determinação dos controlos positivos e negativos de cada fluorocromo para as bactérias utilizadas

Tabela 3.5 - Preparação das amostras de citometria para bactérias Gram-negativas

Tabela 3.6 - Preparação das amostras de citometria para bactérias Gram-positivas

Tabela 4.1 - Resultados da determinação da concentração mínima inibitória da L-Cisteína, segundo o método de microdiluição da norma M7-A6, numa solução de 28mg/mL de L-Cisteína (Legenda: + crescimento bacteriano; CC controlo de crescimento)

Tabelas 4.2 e 3.3 - Resultados da determinação da concentração mínima inibitória da L-Cisteína segundo o método de macrodiluição da norma M7-A6, teste com 0,2 e 0,4% de DTT numa solução inicial de 10% de L-Cisteína (Legenda: + crescimento bacteriano; - ausência de crescimento; CC amostra controlo; (c/DTT) com Dithiothreitol, (s/DTT) sem Dithiothreitol)

Tabela 4.4 - Resultados da determinação da concentração mínima inibitória da L-Cisteína segundo o método de macrodiluição da norma M7-A6 com 0,2% de DTT numa solução inicial de 10% de L-Cisteína (Legenda: + crescimento bacteriano; - ausência de crescimento; CC amostra controlo; (c/DTT) com Dithiothreitol, (s/DTT) sem Dithiothreitol)

Tabela 4.5 - Resultados do ensaio de resistência ao rasgo

Tabela 4.6 - Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-tratadas com TEMPO durante 30min e funcionalizadas a 80oC durante 60min, L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio

Tabela 4.7 - Teste quantitativo efectuado a amostras de algodão, com pré-tratamento com Tempo por 1h e sem pré-tratamento, funcionalizadas por impregnação durante 24h, L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio, para a *Klebsiella pneumoniae*

Tabela 4.8 - Teste quantitativo efectuado a amostras de algodão, com pré-tratamento com Tempo por 1h e sem pré-tratamento, funcionalizadas por impregnação durante 24h, L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio, para a *Staphylococcus aureus*

- Tabela 4.9 - Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-tratadas com TEMPO durante 1h e funcionalizadas a 80°C durante 60min (L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio), para a *Klebsiella pneumoniae*
- Tabela 4.10 - Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-tratadas com TEMPO durante 1h e funcionalizadas a 80°C durante 60min (L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio), para a *Staphylococcus aureus*
- Tabela 4.11 - Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão funcionalizada por impregnação com L-Cisteína durante 24h (L-Cisteína dissolvida com água destilada)
- Tabela 4.12 - Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão funcionalizada com L-Cisteína a 80°C durante 60min, L-Cisteína dissolvida com água destilada
- Tabela 4.13 - Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-activadas com TEMPO durante 60min e funcionalizadas com L-Cisteína a 80°C durante 60min, L-Cisteína dissolvida com água destilada
- Tabela 4.14 - Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-activadas com TEMPO (1h) e funcionalizadas com L-Cisteína a 80°C durante 60min (L-Cisteína dissolvida com água destilada)
- Tabela 4.15 - Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-activadas com TEMPO (1h) e funcionalizadas com L-Cisteína a 80°C durante 120min (L-Cisteína dissolvida com água destilada)
- Tabela 4.16 - Controlos da percentagem de células marcadas pelos fluorocromos avaliada por citometria de fluxo e da redução de viabilidade avaliada pelo método de contagem em placas
- Tabela 4.17 - Percentagem de células marcadas pelos fluorocromos avaliada por citometria de fluxo e redução de viabilidade avaliada pelo método de contagem em placas, ensaios realizados as 2h e para o valor do MIC
- Tabela 4.18 - Percentagem de células marcadas pelos fluorocromos avaliada por citometria de fluxo e redução de viabilidade avaliada pelo método de contagem em placas, ensaios realizados as 24h com células bacterianas extraídas de amostras têxteis após a incubação

## Lista de Acrónimos

Af	Autofluorescência
BOX	Bis-oxonol
CFU	Unidades Formadoras de Colónias
CTC	5-cyano-2,3 ditolyl tetrazolium chloride
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride
DTT	DL-Ditiotreitol
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDX	Energia dispersiva de raio-X
Kp, <i>K. pneumoniae</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
L-Cys	L-Cisteína
MHB	Muller Hington Broth
MIC	Concentração Mínima Inibitória
MLC	Concentração Mínima Letal
PBS	Phosphate buffer saline
PI	Iodeto de Propídio
Sa, <i>S. aureus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
T	temperatura
t	tempo
TEMPO	2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical



# Capítulo 1

## Introdução

### 1.1 Fibras Têxteis

Nos últimos tempos a procura pelos produtos de origem natural tem vindo a aumentar e, como resultado, a procura por fibras têxteis naturais também tem aumentado (Lewin M. *et al*, 1998; Ristić T. *et al*, 2011).

Como fibras têxteis designam-se os elementos filiformes caracterizados conforme a sua flexibilidade, espessura e comprimento em relação à dimensão transversal máxima, sendo usados em aplicações têxteis. O processo de transformação das fibras realiza-se através de diferentes operações, tais como: cardação, penteação, fiação, tecelagem, entre outras (Araújo M. *et al*, 1984).

As fibras têxteis são de várias origens, sendo classificadas de fibras naturais ou sintéticas. As fibras naturais (animais, vegetais e minerais) são produzidas pela natureza sob uma forma que as torna úteis e aptas para o processamento têxtil; por outro lado, as fibras sintéticas são produzidas por processos industriais, quer a partir de polímeros naturais transformados por acção de reagentes químicos, quer por polímeros obtidos por síntese química (Araújo M. *et al*, 1984).

As fibras naturais podem ter origem vegetal, quando obtidas de caules, frutos, folhas e sementes de várias espécies de plantas, como por exemplo, linho, coco, sisal, algodão, etc. Podem ser também de origem animal, provenientes dos pêlos de diversos animais (carneiro, cabras, lama, camelo, coelho, etc.) incluindo os filamentos retirados dos casulos do bicho-da-seda. Finalmente, podem ainda ser de origem mineral, como o amianto; contudo, devido às suas propriedades cancerígenas, a fibra de amianto deixou de se utilizar como fibra têxtil (Araújo M. *et al*, 1984).

Neste trabalho a fibra têxtil que vai ser abordada é o algodão.

As exigências dos consumidores têm vindo a dar preferência ao algodão relativamente às fibras feitas pelo homem, o que mostra que os consumidores consideram que o algodão apresenta vantagens funcionais de conforto e de qualidade em relação ao poliéster (Lewin M. *et al*, 1998).

### 1.1.1 Algodão

O Algodão é a fibra têxtil mais importante. Mundialmente representa cerca de 50% das fibras consumidas. Usado como fibra têxtil há mais de 7000 anos, pode dizer-se que o algodão está ligado à origem mais remota do vestuário e à evolução da produção dos artigos têxteis. No mundo antigo, o algodão representou um importante papel cultural e económico. No México foram encontrados restos de tecidos de algodão que datam de 5800 anos antes de Cristo; a China, no Paquistão, na Índia e no Egito foram encontrados artigos semelhantes de vestuário feito com algodão (Araújo M. *et al*, 1984; Lewin M. *et al*, 1998; Willer H. *et al*, 2009).

A cultura do algodão foi aperfeiçoada nos EUA a partir do século XVIII, estando profundamente ligada à economia e à história dos estados do sul dos Estados Unidos da América, onde contribuiu para o estabelecimento de uma sociedade rica, cuja base laboral era a escravatura negra oriunda de África, usada como mão-de-obra barata para a plantação e colheita manual do algodão (Araújo M. *et al*, 1984).

A produção de algodão aumentou de 13,8 milhões de toneladas em 1980/81 para 26 milhões de toneladas em 2007/08. Os maiores produtores mundiais de algodão são a China, Estados Unidos, Rússia, Brasil, Egito, Turquia, Índia, México, bem como alguns países da África subsariana (Araújo M. *et al*, 1984; Willer H. *et al*, 2009).

A planta do algodão, que é uma árvore, cresce normalmente como perene, mas devido aos propósitos comerciais é cultivada como planta anual e é uma planta que se dá melhor em climas quentes. Em botânica a bola do algodão é um fruto. As fibras de algodão são sementes de plantas da ordem das *Malvales*, da família *Malvaceae*, do grupo *Gossypieae* e do género *Gossypium*. Botanicamente existem quatro espécies principais de algodão com importância comercial (*hirsutum*, *barbadense*, *arboreum* e *herbaceum*); as espécies selvagens não têm muito valor comercial. Cada uma das espécies com interesse comercial tem diferentes propriedades e características desenvolvidas através de programas de reprodução, que produzem continuamente algodões com propriedades melhoradas (maturação rápida, aumento do comprimento, e maior resistência a insectos e doenças) e fibras com maior comprimento, resistência e uniformidade. Adicionalmente aos métodos clássicos de reprodução, os investigadores tentam criar híbridos que produzam novas variedades e para isso tem-se recorrido à engenharia genética para produzir algodões melhorados e mais flexíveis perante as exigências do mercado (Lewin M. *et al*, 1998).

A produção de algodão é ambientalmente responsável, uma vez que as produções minimizam a erosão do solo, perda de nutrientes e a contaminação dos lençóis de água, e usam métodos naturais de protecção das plantações (Lewin M. *et al*, 1998).

O algodão é processado num rigoroso processo de selecção, e conforme a cor e o tipo de fibra assim vai ser a sua classificação. Esta selecção vai influenciar a aplicação e o custo final do produto (Lewin M. *et al*, 1998).

#### 1.1.1.1 Composição química do algodão

A fibra de algodão ‘crua’, após descaroçamento e limpeza mecânica, é essencialmente celulose ( $\approx 95\%$ ). A maior parte dos constituintes não celulósicos do algodão encontra-se na parede primária. Os constituintes não celulósicos são proteínas (compostos azotados), séras, substâncias pécticas, ácidos orgânicos, açúcares e cinzas produtoras de sais inorgânicos, e uma pequena quantidade de um pigmento natural (tabela 1.1). As substâncias não celulósicas podem ser selectivamente removidas por solventes apropriados, como por exemplo, clorofórmio e outros solventes orgânicos removem as ceras mas não outras impurezas; o etanol, por sua vez, remove ceras, açúcares e algumas cinzas produtoras de sais inorgânicos, mas não proteínas ou pectinas; e a água remove sais inorgânicos (metais), açúcares, aminoácidos, proteínas e péptidos de baixo peso molecular. Estes constituintes são removidos quase completamente fervendo a fibra em hidróxido de sódio aquoso, lavagem ou ebulição de Kier, e depois cuidadosamente lavada com água (Lewin M. *et al*, 1998).

**Tabela 1.1:** Composição típica das fibras de algodão (adaptado de Lewin M. *et al*, 1998)

Constituinte	Composição (% peso seco)
Celulose	95,0
Proteínas (%N)	1,3
Substâncias pécticas	1,2
Cinzas	1,2
Ceras	0,6
Açúcares totais	0,3
Pigmentos	Vestígios
Outros	1,4

De todos os compostos não celulósicos, as proteínas (compostos azotados) constituem as que se encontram em maior percentagem. Os compostos azotados encontram-se principalmente no lúmen da fibra, mais especificamente no resíduo protoplasmático, e uma pequena porção também pode ser encontrada na parede primária. A fibra de algodão e a sua parede primária contêm proteínas/péptidos, aminoácidos livres e também azoto não proteico. Os principais aminoácidos livres existentes nas fibras de algodão são o glutamato, o aspartato, a valina, a

serina e a treonina. Os compostos azotados podem ser removidos por uma leve lavagem alcalina como as que são usadas em alguns processos de tingimento e acabamento de têxteis em algodão (Lewin M. *et al*, 1998).

#### 1.1.1.2 Propriedades estruturais do algodão

A fibra de algodão é composta na sua maioria por moléculas de celulose (hidrato de carbono de longa cadeia) e açúcar das paredes celulares. Outras fontes comerciais de fibras de celulose, para além do algodão, incluem o linho, cânhamo e rami. Fibras de madeira são usadas no fabrico de papel e também como matéria-prima para o fabrico de fibras de raiom. Destas fontes a celulose proveniente do algodão é a mais pura. Os investigadores têm vindo a estudar outras formas de produção de celulose, nomeadamente a partir de algas e tunicatos. Algumas bactérias, como a *Acetobacter xylinum*, produzem grandes quantidades de celulose extracelular. Esta celulose forma uma película protectora na superfície do meio de crescimento. Por sua vez, no algodão bem como em outras plantas e nas algas, a celulose encontra-se nas paredes das células individuais (Gacén J.G. *et al*, 1987; Lewin M. *et al*, 1998).

Tipicamente, a celulose na parede celular está em pequenas e cristalinas microfibrilas que estão organizadas em estruturas de multicamadas. As fibras de algodão possuem muitos níveis de organização estrutural e as suas propriedades estruturais dependem desta complexidade. Apesar de as moléculas de celulose se encontrarem associadas como cristais, a celulose é considerada amorfa (Gacén J.G. *et al*, 1987; Lewin M. *et al*, 1998).

A degradação da celulose por hidrólise, oxidação e outras reacções químicas mostra que existe 1 → 4 ligado ao polímero linear de β-D-glucopirranose. No algodão não degradado o comprimento molecular da cadeia é expresso como grau de polimerização, que pode ser superior a 20.000 unidades de D-glucopiranosil monomérico (peso molecular de 3.280.000 daltons). Como foi removida a molécula de água dos monómeros de celulose, ela é referida como unidades de glucose anidra ou resíduos de glucose, como todos os resíduos de glucose tem anéis com seis átomos (Gacén J.G. *et al*, 1987; Lewin M. *et al*, 1998).

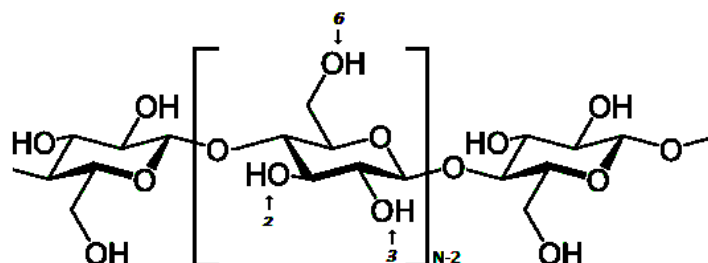
O algodão é uma fibra têxtil única devido às inter-relações das suas subunidades. Dos componentes variados da sua parede primária, passando pela celulose pura da parede secundária e até ao lúmen, a organização das unidades de fibras dá à fibra propriedades características que a tornam processável, forte e confortável como fibra têxtil. A cutícula primária da fibra, parede celular, é composta por uma rede interna de microfibrilas aleatoriamente organizadas numa mistura de ceras, pectinas, proteínas e outros componentes não celulósicos. Na fibra seca, as microfibrilas estão presentes numa rede de entrecruzamentos, fios tipo filamentos que revestem



por completo o interior da fibra. Os componentes não celulósicos da parede celular concedem à superfície da fibra uma aparência não-fibrilar, conferindo-lhe hidrofobicidade e uma superfície lubrificada para processamento. Os componentes ‘cerosos’ da parede primária têm de ser parcialmente removidos de modo a permitir que os acabamentos e corantes químicos penetrem no corpo da fibra. Dentro da parede primária uma fina camada, chamada camada de enrolamento, consiste em bandas de microfibrilas helicoidais estabelecidas numa rede entrecruzada que está associada com a parede primária e com a secundária (Gacén J.G. *et al*, 1987; Lewin M. *et al*, 1998).

### 1.1.1.3 Propriedades químicas

Como a fibra de algodão é predominantemente constituída por celulose, a sua reactividade química é a mesma do polímero de celulose,  $\beta$ -1,4-glucano. Através da estrutura química é possível verificar que os grupos 2-OH, 3-OH e 6-OH estão disponíveis para as mesmas reacções químicas que ocorrem com os álcoois (figura 1.1). Onde se encontra o glucano solúvel em água, por razões estéricas, o 6-OH primário será aquele que está mais disponível para uma reacção. Contudo, as cadeias de moléculas de celulose associam-se entre si formando pontes de hidrogénio e ligações hidrofóbicas intramoleculares. Estas interacções formam microfibrilas que são depois organizadas em macrofibrilas, e estas por sua vez organizam-se em fibras (Gacén J.G. *et al*, 1987; Lewin M. *et al*, 1998).



**Figura 1.1:** As reacções de agentes químicos com a celulose são quase exclusivamente com os grupos 2, 3 e 6 OH, grupos esses que não estão envolvidos na formação de polímeros lineares que consistem em unidades D-anidroglicose unidas por ligações  $\beta$ -1,4 (adaptado de Lewin M. *et al* 1998)

O algodão é sujeito a muitos tratamentos que intensificam os efeitos de mercerização e mudanças na sua estrutura cristalina. Os agentes utilizados devem ter a capacidade de interagir e quebrar a estrutura cristalina nativa de forma a transformá-la em diferentes polimorfos. As reacções químicas da indústria geralmente envolvem fibras mercerizadas que retêm uma estrutura cristalina, portanto reacções com esta estrutura cristalina em polímeros insolúveis em água são heterogéneas. Agentes químicos que têm acesso aos poros internos da fibra encontram muitos locais potencialmente reactivos não disponíveis para reacções devido ao envolvimento em ligações hidrogénio. Através de medições químicas com base em reacções com cloreto de dietil-

amino-etil, sob condições suaves, é possível verificar uma disponibilidade decrescente de grupos hidroxilo no algodão,  $2\text{-OH} > 6\text{-OH} \gg 3\text{-OH}$ . A reactividade total dos grupos hidroxilo da celulose e as reactividades relativas dos grupos 2-OH, 3-OH e 6-OH divergem dependendo do pré-tratamento de mercerização, os reagentes e as condições das reacções. A celulose é hidrofílica e expande em contacto com água, normalmente considera-se que as interacções entre celulose e água ocorrem em regiões intercristalinas ou na superfície de cristalitos e na estrutura bruta (Gacén J.G. *et al*, 1987; Lewin M. *et al*, 1998).

O algodão tingi mais facilmente depois de ter sido tratado e preparado adequadamente. A preparação de têxteis de algodão para o tingimento inclui procedimentos como desengomagem, lavagem, branqueamento e mercerização. Estes tratamentos são essenciais para limpar o algodão através da remoção de impurezas, constituintes não celulósicos e outras substâncias desnecessárias, e para aumentar a afinidade da celulose aos corantes. Adicionalmente, a intensidade da cor pode ser potenciada através de tratamentos enzimáticos, do algodão, quer antes ou depois do tingimento (Gacén J.G. *et al*, 1987; Lewin M. *et al*, 1998).

#### 1.1.1.4 Biodegradação

A biodegradação da celulose é causada por enzimas, as celulasas, que são produzidas por diversos microrganismos (bactérias e fungos). As celulasas mais estudadas são as de origem fúngica, como por exemplo, *Trichoderma*; as bactérias que digerem a celulose são comunidades anaeróbicas (Lewin M. *et al*, 1998).

A degradação é uma função da área de superfície disponível e da cristalinidade da celulose e a reacção primária da degradação enzimática da celulose é a hidrólise, Nas indústrias têxteis a degradação biológica da celulose é bastante estudada, bem como o uso de enzimas em vários tipos de acabamentos dos tecidos. A fibra de algodão é uma forma bastante cristalina da celulose e a capacidade dos vários microrganismos para degradar esta forma da celulose é bastante rara, e devido à sua natureza sólida e insolubilidade é também bastante lenta. Os componentes não celulósicos da fibra de algodão são nutrientes importantes para a manutenção das comunidades microbianas responsáveis pela degradação extensiva da celulose, mas na fibra de algodão purificada estes compostos existem em quantidades demasiado baixas para terem importância significativa (Lewin M. *et al*, 1998).

Nos dias de hoje existe uma grande preocupação com os efeitos que os diversos materiais possam ter no ambiente, por isso pretende-se que os produtos lançados no mercado tenham um elevado grau de biodegradabilidade num curto espaço de tempo. Existem testes para determinar a degradabilidade dos materiais, bem com a sua resistência a fungos e bactérias que também são

responsáveis pela degradação. Uma substância considerada biodegradável deve decompor-se completamente em elementos presentes na natureza. A celulose é claramente biodegradável, mas apesar de o algodão ser considerado 100% biodegradável, a sua percentagem de degradação depende das condições do ambiente onde se encontra (Lewin M. *et al*, 1998).

#### 1.1.1.5 Propriedades físicas do algodão

A maturidade da fibra geralmente abrange o grau de desenvolvimento ou de espessura da parede secundária da fibra e depende das condições de crescimento que controlam o grau de desenvolvimento e ainda acontecimentos catastróficos como o fim prematuro do crescimento, e também outros factores como infestações de insectos, doenças ou clima. A maturidade das fibras de algodão consiste na espessura relativa da parede celular, relativamente ao perímetro ou ao diâmetro da fibra (Lewin M. *et al*, 1998).

Para a selecção de um algodão que vai ser usado em processos industriais é importante conhecer o grau de maturidade, que irá determinar a qualidade final do produto que está relacionada com a tingibilidade e a facilidade de processamento. Algodões que não estejam suficientemente maduros tendem a não tingir uniformemente, a produzir grandes quantidades de resíduos e a ter um grande número de quebras e falhas na fiação e tecelagem (Lewin M. *et al*, 1998).

A maturidade de uma fibra pode ser medida directa ou indirectamente. No geral, os métodos directos são mais exactos e precisos, mas muito mais lentos e tediosos que os métodos indirectos. Na prática, os métodos directos são utilizados para calibrar ou estandardizar os métodos indirectos. Os métodos directos mais comuns são: teste de *caustic swelling*, teste de luz polarizada e método de referência de análise das secções transversais das fibras. Os métodos indirectos são caracterizados pela rapidez e precisão, e são credíveis o suficiente para serem aplicados nos sistemas de comercialização do algodão. Estes métodos dividem-se em método de *double compression airflow* e NIRS (*near-infrared reflectance spectroscopy*) (Lewin M. *et al*, 1998).

O termo 'delicadeza' da fibra tem diversos significados e interpretações, mas os parâmetros mais utilizados para o definir incluem o diâmetro, perímetro, área de corte transversal, massa por unidade de comprimento e superfície específica da fibra (Lewin M. *et al*, 1998).

O conhecimento do comportamento tênsil das fibras têxteis, reacção à força axial, é essencial na selecção da fibra apropriada para cada aplicação. O algodão é a única fibra têxtil cuja força aumenta com a humidade, enquanto a maioria das outras é enfraquecida pelo aumento da humidade. Normalmente as fibras têxteis perdem força com o aumento da temperatura. Quanto

mais tempo durar o stress provocado à fibra, maior será a probabilidade de ocorrerem danos. Do mesmo modo, a presença de impurezas num material leva ao aumento da desordem e à fraqueza. A reacção de um material à tensão de tracção é esticar ou alongar, designada por deformação de tracção (Lewin M. *et al*, 1998).

As fibras têxteis são expostas a uma grande variedade de forças dinâmicas e a sua resposta ao stress em movimento é o que melhor caracteriza a sua performance durante o processamento ou o uso final. Para quantificar a resposta dinâmica do material é necessário verificar o alongamento correspondente ao aumento da carga, que representa a resposta de resistência do algodão até ao ponto de ruptura. As rugosidades de uma fibra de algodão são o parâmetro menos importante comparado com os outros factores nas propriedades de tensão do algodão, mas estas têm um papel importante no fenómeno da coesão das fibras, propriedade que mantém tudo unido. Sem a coesão seria impossível tecer o fio das fibras descontínuas. No caso das fibras sintéticas as rugosidades têm de ser artificialmente induzidas através de esquemas texturantes (Lewin M. *et al*, 1998).

A capacidade de deformação que uma fibra apresenta é denominada de alongação e a elasticidade é a sua capacidade em voltar à sua forma original, estas propriedades são altamente dependentes do tempo. A elasticidade do algodão é imperfeita pois não volta completamente à sua forma inicial após ter sido deformada. A resiliência de uma fibra está relacionada com a proporção de energia absorvida e de energia recuperada quando uma fibra é esticada e depois libertada, o algodão não é uma fibra muito resiliente. A rigidez de uma fibra é outro dos parâmetros elásticos bastante importantes na descrição da resistência de uma fibra à torção (Lewin M. *et al*, 1998).

#### 1.1.1.6 Aplicações

A versatilidade do algodão faz com que este seja a fibra têxtil com maior número de aplicações. As suas utilizações podem ser classificadas em três grupos principais, vestuário, decoração e industrial. Na indústria do vestuário o algodão é utilizado em quase todos os tipos de roupa, desde calças, roupa interior ou camisolas. Na área da decoração as suas principais aplicações são as toalhas de banho, lençóis, cortinados e toalhas de mesa. O chamado uso industrial é bastante vasto, engloba desde lonas, encadernações de livros, a fechos, mas a sua principal utilização é em equipamentos médicos e no segmento industrial (Lewin M. *et al*, 1998).

Nas aplicações médicas e de cuidados de saúde do algodão existem diferentes usos, internos (roupas cirúrgicas, vários implantes e fios de sutura) ou externos (gases, ligaduras, máscaras cirúrgicas, roupas e pijamas, tolhas, tampões, entre outros) (Ristić T. *et al*, 2011).

O algodão também é bastante requisitado pelo exército, pois as suas fardas e equipamentos de apoio são na sua maioria compostos exclusivamente por algodão (Lewin M. *et al*, 1998).

As fibras de celulose têm uma vasta aplicação no campo dos têxteis médicos devido às suas características únicas, tais como humidade elevada e adsorção de líquidos, baixo conteúdo de impurezas, propriedades anti-estáticas e boas propriedades mecânicas. Contudo, a celulose é uma excelente superfície para o crescimento e desenvolvimento de microrganismos. Devido à sua estrutura molecular e a uma vasta superfície activa, as fibras de celulose são também uma boa matriz para o desenvolvimento de materiais inteligentes, bioactivos e biocompatíveis. A celulose é um dos materiais básicos mais atractivos para a funcionalização antimicrobiana; a modificação da superfície das fibras de celulose é considerada actualmente uma das melhores vias para obter uma funcionalidade moderna nos têxteis com aplicações médicas (Ristić T. *et al*, 2011).

## 1.2 Têxteis antimicrobianos

A necessidade de utilizar tecidos com propriedades antimicrobianas surgiu durante a II Guerra Mundial, quando os tecidos de algodão eram muito usados para fins militares. Por razões relacionadas com as condições de utilização inerentes, os tecidos precisavam de ser protegidos contra o apodrecimento causado por agentes microbianos. O algodão era tratado com misturas de ceras com cloro e sais de cobre e antimónio que reforçavam os tecidos contra a biodegradação, conferindo-lhes, contudo, um odor peculiar. Estes agentes tinham efeitos nefastos também ao nível dos efluentes líquidos, mas na época, os potenciais efeitos poluentes da aplicação de tais materiais, bem como a toxicidade relacionada, não eram tidos em grande consideração (Ramachandran T. *et al*, 2004).

Em meados da década de 1950, os fungicidas mais utilizados em tecidos de algodão eram os sais de 8-hidroxigiunolina e os compostos de cobre, amoníaco e cloro. Foi realizado um considerável número de estudos para melhorar e modificar quimicamente a resistência dos tecidos ao apodrecimento e melhorar outras propriedades, por acetilação e cianoetilção do algodão. Porém, estes tratamentos limitaram a aceitação pela indústria, devido aos custos relativamente elevados e à perda de resistência do tecido em transformação (Ramachandran T. *et al*, 2004).

Há muito tempo que os têxteis foram reconhecidos como suportes ideais para o crescimento de microrganismos como fungos e bactérias. Estes microrganismos são encontrados, na sua maioria, em qualquer ambiente, e multiplicam-se rapidamente apenas em condições básicas, como humidade, nutrientes e temperatura. A maioria das fibras sintéticas, devido à sua elevada

hidrofobicidade, é mais resistente aos ataques de microrganismos do que as fibras naturais. As proteínas, nas fibras queratinosas, e os hidratos de carbono, no algodão, actuam como nutrientes e fontes de energia em certas condições; terra, pó, fluidos corporais e acabamentos de certos têxteis, também podem ser fontes de nutrientes para os microrganismos (Gao Y. *et al*, 2008).

Os têxteis antimicrobianos podem ser classificados em duas categorias, nomeadamente como passivos e activos, baseando-se na sua actividade contra os microrganismos. Os materiais passivos não contêm qualquer substância activa, mas a sua superfície produz efeitos negativos nas condições de vida dos microrganismos. Consideram-se activos os materiais que possuem substâncias com actividade anti-microbiana e que actuam tanto dentro como no ambiente que envolve a célula (Ramachandran T. *et al*, 2004).

Estima-se que a produção de têxteis antimicrobianos tenha uma magnitude de 30% na Europa ocidental, relativamente à produção a nível mundial. No futuro, calcula-se que haja um aumento de cerca de 15% na produção europeia nos próximos anos, fazendo com que este seja um dos sectores do mercado dos têxteis com mais rápido crescimento. Roupa desportiva, meias, forros de sapatos e *lingerie* perfazem 85% da produção total destes têxteis. Também existe um extenso mercado de fibras antimicrobianas nos têxteis de exteriores, filtros de ar, componentes automóveis, têxteis do lar e medicinais. A elevada procura deste tipo de materiais estimulou intensivamente a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos (Gao Y. *et al*, 2008).

De facto, o crescimento de microrganismos nos têxteis apresenta uma série de efeitos indesejados, não apenas nos próprios têxteis, mas também em quem os utiliza. Estes efeitos incluem o aparecimento de um odor desagradável, manchas, descoloração do material, redução da força mecânica do têxtil e um aumento da probabilidade de contaminação. Por estas razões, é necessário que o crescimento dos microrganismos nos têxteis, durante o seu uso e armazenamento, seja minimizado (Gao Y. *et al*, 2008).

As fibras têxteis fabricadas com propriedades anti-microbianas podem ser utilizadas em separado ou em associação com outras fibras. As fibras bioactivas são formas modificadas que incluem quimioterapias na sua estrutura por funcionalização com drogas sintéticas com propriedades bactericidas e fungicidas (Ramachandran T. *et al*, 2004). Têm-se verificado diversos progressos recentes no tratamento antimicrobiano de fibras sintéticas, de algodão e de lã, ou de fibras que contêm diversos agentes bioactivos e são usados nestes produtos pelos principais fabricantes (Gao Y. *et al*, 2008).

### 1.2.1 Acabamentos antimicrobianos

Existem vários métodos para melhorar a durabilidade do acabamento, os quais incluem a insolubilização das substâncias activas sobre as fibras, o tratamento da fibra com resina, condensados ou ligantes, a micro-encapsulação dos agentes antimicrobianos com a fibra matriz, o revestimento da superfície da fibra, a modificação química da fibra por formação de ligações covalentes e o uso de misturas com polímeros/homo-polímeros ou co-polimerização sobre a fibra (Gao Y. *et al*, 2008).

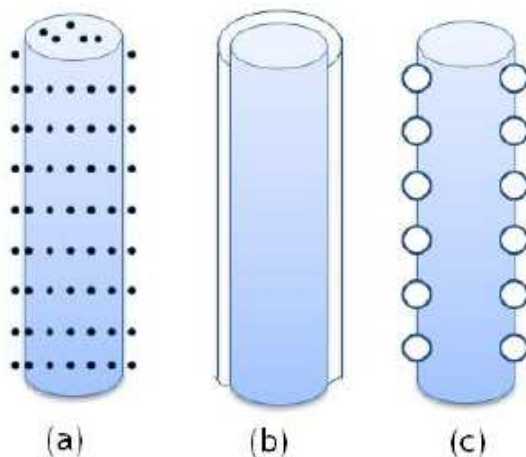
Para se seleccionar um agente antimicrobiano é necessário ter em conta algumas condições: que seja eficaz contra um amplo espectro de bactérias e fungos, ter baixa toxicidade para o utilizador, o método de incorporação e a capacidade de fixação e não devem ter um custo muito elevado (Gao Y. *et al*, 2008; Ren X. *et al*, 2009; Tomšić B. *et al*, 2009; Kangwansupamonkon W. *et al*, 2009).

Dependendo da utilização que se pretende dar ao material têxtil assim deve ser a capacidade de fixação do composto; se o propósito for um têxtil descartável é suficiente que o agente antimicrobiano tenha uma capacidade de fixação razoável, mas se pelo contrário o têxtil for para uso continuado, é indispensável que o agente antimicrobiano tenha uma grande capacidade de fixação e permanência no material, para que o efeito antimicrobiano não seja eliminado aquando da lavagem do mesmo (Ren X. *et al*, 2009; Tomšić B. *et al*, 2009)

As principais condições que a aplicação de um acabamento antimicrobiano sobre materiais têxteis deve ter em conta são: não deverá alterar de forma negativa o aspecto e características do material, deve ser compatível com os métodos e substâncias químicas usados na produção do têxtil, ser resistente às condições atmosféricas (luz solar, humidade) e fluidos corporais, não deverá afectar a flora bacteriana presente nas zonas de aplicação bem como deverá evitar reacções alérgicas e/ou irritação. É importante que no final do acabamento o material seja submetido a testes de compatibilidade, citotoxicidade e irritabilidade, para certificar que o produto oferece segurança ao utilizador (Gao Y. *et al*, 2008; Ramachandran T. *et al*, 2004; Schindler W. *et al*, 2005).

De forma a conferir propriedades antimicrobianas e a desenvolver têxteis biomédicos são utilizadas principalmente duas técnicas para a funcionalização de fibras, técnicas utilizadas também em outros processos de produções de têxteis. Estes métodos consistem em diferentes formas de adesão do agente antimicrobiano às fibras e a selecção do método de funcionalização depende do agente e do tipo de fibra (Ristić T. *et al*, 2011).

Os agentes antimicrobianos podem ser aplicados durante o processo de tratamento ou incorporados na solução do polímero antes da extrusão ou da fiação por via húmida (figura 1.2a). A substância embebida na estrutura da fibra tem de migrar até à superfície e ser lentamente libertada durante a utilização de modo a ser eficiente. Este processo é mais apropriado para fibras sintéticas (Ristić T. *et al*, 2011).



**Figura 1.2:** O agente antimicrobiano está incorporado nas fibras (a), aplicado na superfície da fibra (b) e ligado quimicamente às fibras (c) (adaptado de Ristić T. *et al*, 2011)

Como processo de acabamento antimicrobiano, adequado a fibras naturais e sintéticas, utilizam-se métodos como *conventional exhaust* (esgotamento) e *pad-dry* (impregnação) (figura 1.2b). Adicionalmente também se pode recorrer a métodos como *spraying*, espumas e revestimento, bem como ao uso de soluções coloidais nanométricas, nanopartículas, modificação química do agente antimicrobiano para formação de ligações covalentes com a fibra (esgotamento) (figura 1.2c), crosslinking do agente activo com a fibra usando crosslinkers e processos sol-gel (Ristić T. *et al*, 2011).

### 1.2.2 Compostos antimicrobianos

Várias das classes mais importantes de agentes antimicrobianos são usadas na indústria têxtil. Geralmente, estes só por si não são novos e têm sido utilizados nas mais variadas indústrias. Porém, a sua adesão à superfície têxtil ou incorporação nas fibras reduz a sua actividade e limita a sua disponibilidade. Além disso, as suas propriedades podem perder-se gradualmente durante o uso e as lavagens dos têxteis. Por estas razões, é necessário aplicar grandes quantidades destes produtos nos têxteis para controlar o crescimento bacteriano e manter a sua durabilidade (Gao Y. *et al*, 2008; Gouveia I.C., 2010).



Alguns dos agentes mais usados neste tipo de materiais têxteis são compostos químicos, e como tal têm os seus riscos para o ambiente e para o corpo humano. Os principais compostos utilizados como agentes antimicrobianos são os metais e os sais metálicos, compostos quaternários de amoníaco, PHMB (polyhexametileno biguanide), triclosano, N-halamina, peróxidos regeneráveis e alguns corantes (Gao Y. *et al*, 2008; Gouveia I.C., 2010; Ristić T. *et al*, 2011).

A utilização de compostos sintéticos pode dar origem a várias consequências indesejadas, em particular, multi-resistência bacteriana e potencial contaminação dos efluentes devido às elevadas dosagens aplicadas e à baixa ligação aos materiais têxteis. Desta forma, tem vindo a aumentar o desenvolvimento de novas técnicas e processos que utilizem agentes antimicrobianos de origem natural, devido não só à sua elevada biodegradabilidade mas também à possível redução de reacções adversas causadas nos utilizadores e nos próprios materiais (Borkow G. *et al*, 2008; Ristić T. *et al*, 2011; Schindler W. *et al*, 2005).

A tendência crescente para substituir compostos químicos nocivos tem levado à grande procura de compostos naturais. Estes compostos apresentam grandes vantagens em relação aos sintéticos, nomeadamente a baixa incidência de reacções adversas para o utilizador em comparação com os produtos sintéticos. Alguns destes compostos também apresentam outras propriedades que podem ser benéficas (antioxidantes), e se associadas com as propriedades antimicrobianas podem ser consideradas uma mais-valia no desenvolvimento de têxteis de aplicação médica (anti-inflamatórios e anti-cancerígenos), mas é preciso controlar os níveis de radicais livres (espécies reactivas de oxigénio) para não ocorrerem reacções adversas. Os principais compostos naturais utilizados são o quitosano, os corantes naturais, o aloé vera, extractos e óleos essenciais de algumas plantas, alginato, mel, e aminoácidos (sericina, cisteína, etc.) (Gao Y. *et al*, 2008; Gouveia I.C., 2010; Joshi M. *et al*, 2009; Ramachandran T. *et al*).

Apesar de existirem inúmeras vantagens associadas à utilização de compostos de origem natural ainda é preciso investigar e desenvolver mais a fundo, pois os extractos são difíceis de obter e purificar e normalmente são extraídos em poucas quantidades. Para além disso, uma das maiores limitações dos acabamentos antimicrobianos com agentes naturais é a sua baixa durabilidade e resistência. Actualmente apenas os compostos de origem sintética são aplicados em fibras têxteis para usos comerciais (Joshi M. *et al*, 2009; Gao Y. *et al*, 2008; Gouveia I.C., 2010).

### 1.2.2.1 Compostos antimicrobianos sintéticos

#### a) Metais e sais metálicos

Alguns metais como cobre, zinco, cobalto, cádmio e mercúrio têm grande interesse como agentes antimicrobianos para aplicação em substratos têxteis, mas a prata é sem dúvida o mais utilizado. Muitos destes compostos são metais pesados. Mesmo a baixas concentrações, são tóxicos para o metabolismo dos microrganismos, quer no seu estado livre ou combinado com outros compostos. (Michielsen S. *et al.*, 2004; Gao Y. *et al.*, 2008).

O desenvolvimento de materiais antimicrobianos em que o ião prata é aplicado como revestimento final na superfície das fibras é muito procurado pois esses materiais apresentam uma elevada actividade antimicrobiana, mas a cor dos artigos finais é afectada negativamente. Da mesma forma que durante a utilização do material e na presença de humidade a prata difunde até à superfície da fibra formando iões de prata, o seu uso prolongado em feridas pode causar pigmentação no corpo devido à captação pela pele de quantidades elevadas de ião prata (Michielsen S. *et al.*, 2004; Gao Y. *et al.*, 2008).

A aplicação de um tratamento com metais em fibras naturais só pode ser introduzido como última etapa do acabamento final; diversas estratégias foram avaliadas para aumentar a sua captação e durabilidade do efeito antimicrobiano. As fibras de algodão foram submetidas a um pré tratamento com ácido succínico anidro, que actua como um ligante de iões metálicos, de forma a aumentar e reforçar a adsorção dos sais metálicos na fibra ( $\text{Ag}^+$  e  $\text{Cu}^{2+}$ ), propiciando uma actividade antibacteriana mais eficiente (Purwar R. *et al.*, 2004; Gao Y. *et al.*, 2008).

Os tratamentos antimicrobianos à base de iões metálicos têm no entanto uma série de limitações, pois podem causar danos ambientais e de saúde. (Gao Y. *et al.*, 2008).

#### b) Compostos quaternários de amónio

Os compostos de amónio quaternário são usados como bacteriostáticos e agentes desinfectantes em fibras têxteis. A presença de uma carga positiva no átomo de azoto dos compostos quaternários é responsável por uma série de mecanismos destrutivos dos microrganismos, incluindo danos na membrana celular, desnaturação das proteínas e ruptura da estrutura celular (Gao Y. *et al.*, 2008).

Durante o processo de inactivação da célula microbiana, os grupos de amónio quaternário mantêm-se inalterados e mesmo após a sua ligação com a fibra retêm as suas propriedades antimicrobianas (Gao Y. *et al.*, 2008).

O algodão, a lã, o poliéster e o *nylon* são alguns dos têxteis onde é mais comum a aplicação destes compostos. No caso do poliéster, existem grupos carboxílicos ou sulfídrico que permitem a absorção do composto. Alguns compostos de azoto reagem com a lã por intermédio dos seus grupos tiol livres, com os resíduos sulfídrico da cisteína ou com a cistina presente na lã, formando uma ligação dissulfureto assimétrica. Por sua vez, o algodão é pré-tratado para que o número de grupos azotados aumente e a absorção dos compostos seja facilitada. Deduz-se que esta ligação covalente de amoníaco quaternário favorece uma actividade anti-microbiana com maior permanência (Gao Y. *et al*, 2008).

#### c) PHMB (polihexametileno de biguanida)

Os compostos de polihexametileno de biguanida apresentam um eficaz e largo espectro bactericida contra bactérias Gram-positivas, Gram-negativas e fungos. São actualmente usados comercialmente, uma vez que apresentam baixa toxicidade e um impacto ambiental moderado resultante da sua aplicação, este composto é aplicado em fibras de algodão, lã e misturas lã/algodão (Gao Y. *et al*, 2008).

Uma das vantagens associadas a este composto é o facto de raramente ter sido detectada resistência bacteriana. Todavia, as aplicações comerciais do polihexametileno de biguanida não são muito estáveis, pois nos artigos que são sujeitos a repetidas lavagens pode haver uma descoloração e perda da actividade antimicrobiana. Contudo, a realização de um pós tratamento à base de compostos orgânicos permite aumentar a durabilidade do efeito antimicrobiano assim como suprimir o amarelecimento do têxtil. Outros detergentes, nomeadamente os que apresentam surfactantes aniónicos na sua composição podem dar origem a resíduos nos materiais têxteis, e desta forma as propriedades dos materiais têxteis são alteradas após lavagem e são acompanhadas de perda de actividade anti-microbiana (Gao Y. *et al*, 2008).

#### d) Triclosano (compostos fenólicos)

De entre os compostos fenólicos, o triclosano (2,4,4-tricloro-2- hidoxidifeniléter), é o mais utilizado em aplicações para preparar materiais antimicrobianos (Gao Y. *et al*, 2008).

Sendo uma molécula relativamente pequena, o triclosano pode também actuar como um corante disperso, podendo ser aplicado antes ou durante o processo de tingimento das fibras têxteis. Durante o uso do têxtil, o agente bioactivo migra até à superfície do tecido a uma taxa lenta mas regular para garantir um efeito antimicrobiano eficaz e contínuo (Gao Y. *et al*, 2008).

Sabe-se também que a sua actividade contra fungos não é tão significativa e a resistência bacteriana a este composto suscita uma enorme preocupação por parte dos investigadores, tendo

sido banido em alguns países europeus. Além disso, o triclosano é reactivo quando exposto à luz solar formando compostos tóxicos da família das dioxinas, devido ao rompimento de ligações existentes na molécula de triclosano (Gao Y. *et al*, 2008).

#### e) N-halamina

O polímero N-Halamina tem recebido especial atenção para aplicação em têxteis antimicrobianos devido à sua actividade anti-bacteriana duradoura ser consequência da sua forte capacidade de regeneração. Por outro lado, demonstrou também ser capaz de eliminar um vasto conjunto de microrganismos sem perturbar os ecossistemas. A sua forte acção bactericida é atribuída às propriedades oxidativas das ligações de Halamina (Cl-N) (Sun Y. *et al*, 2002).

Os compostos derivados de N-Halamina já são utilizados como desinfectantes no tratamento de águas e a sua incorporação em materiais têxteis tem tido excelentes resultados (Sun Y. *et al*, 2002).

Em tempos foi desenvolvido um material têxtil à base de fibras de algodão, que possui uma actividade anti-microbiana duradoura e regenerável, graças a um composto derivado de hidantoina, ou monometilol-5,5-dimetilhidantoina. Este elemento actua como precursor para a síntese de um composto bactericida do grupo das Halaminas. Durante o processo de agregação, o anel existente no hidantoina é ligado covalentemente ao substrato celulósico das fibras de algodão. A junção do anel heterocíclico com a estrutura celulósica não é afectada pelas sucessivas lavagens do tecido mesmo depois de aplicado o processo de branqueamento (Sun G. *et al*, 2001).

#### f) Peróxidos regeneráveis

Estima-se que compostos fotocatalíticos como dióxido de titânio, óxido de zinco, sulfureto de cádmio e sulfureto de zinco contêm um elevado potencial antimicrobiano. No entanto, é o dióxido de titânio que expressa em simultâneo maior poder fotocatalítico, actividade oxidante e estabilidade (Kangwansupamonkon W. *et al*, 2009).

A utilização de dióxido de titânio, como agente fotocatalítico, para a degradação de misturas orgânicas e até mesmo de microrganismos, como vírus, bactérias e células cancerígenas, está em fase de investigação, assim como a sua aplicação para a esterilização de material médico-cirúrgico, produtos alimentares, filtros de ar condicionado e superfícies sanitárias (Kangwansupamonkon W. *et al*, 2009; Shieh K.J. *et al*, 2006).

Embora o elevado poder oxidante do dióxido de titânio seja positivo para determinadas aplicações, esta característica pode provocar danos. A aplicação directa de dióxido de titânio em materiais orgânicos, como plásticos, pode conduzir a uma degradação do material levando à fragmentação da superfície. Um efeito de degradação fotoquímica foi igualmente observado em materiais têxteis e papeleiros. Para solucionar este problema, foi proposta a utilização de dióxido de titânio com uma cobertura de apatite. Esta cobertura permite que os compostos químicos e biológicos sejam degradados pelo dióxido de titânio, sem este estar em contacto directo com o material. O facto de a apatite ser bastante porosa, permite que os compostos sejam rapidamente absorvidos (Kangwansupamonkon W. *et al*, 2009; Schmidt H. *et al*, 2005)

#### g) Corantes sintéticos

Alguns corantes sintéticos utilizados na indústria têxtil foram especificamente concebidos com actividade anti-microbiana. A coloração e o acabamento antimicrobiano podem ser alcançados simultaneamente se forem escolhidos corantes específicos que exibam actividade antimicrobiana; os níveis de actividade antimicrobiana estão dependentes das estruturas dos corantes. (Gao Y. *et al*, 2008; Joshi M. *et al*, 2009; Ma M.H. *et al*, 2005)

Uma série de corantes azo dispersos, preparados através da reacção de derivados de cloreto de sulfenilamido diazónio, demonstraram excelentes resultados de tingimento e efeito antimicrobiano, quando aplicados em lã e *nylon* (Han S. *et al*, 2005; Gao Y. *et al*, 2008).

Outra forma de se conseguir um acabamento que seja, em simultâneo, antimicrobiano e de coloração, consiste em fixar o composto bioactivo a um corante por meio de ligações covalentes. Por exemplo, novos corantes catiónicos foram sintetizados através da ligação de compostos de amónio quaternário ao grupo amino-araquinónico do cromóforo, tendo demonstrado diferentes níveis de actividade anti-microbiana conforme as suas estruturas, mas quando aplicados a fibras acrílicas a durabilidade diminui (Gao Y. *et al*, 2008).

#### 1.2.2.2 Compostos antimicrobianos naturais

##### a) Polissacáridos naturais (alginato, dextrano, ácido hialurónico)

Desempenham um papel importante no revestimento de superfície para materiais utilizados em aplicações médicas, os mais comuns são o dextrano, o ácido hialurónico, a carboximetil celulose, a heparina, o alginato e outros. Copolímeros de alginato são utilizados principalmente em pensos para feridas, devido à sua elevada capacidade de absorção, já o ácido hialurónico é utilizado na cicatrização de feridas em meio húmido. A heparina é geralmente utilizada para revestir veias

artificiais de tereftalato de polietileno, melhorando assim a sua biocompatibilidade (Ristić T. *et al*, 2011).

#### b) Quitosano

O quitosano é um biopolímero linear que deriva da N-desacetilação alcalina parcial da quitina. Normalmente, é obtido a partir do exoesqueleto de crustáceos marinhos (caranguejos, lagostas, camarão) e de fungos. Devido às suas excelentes propriedades tais como, baixa toxicidade, biocompatibilidade, boa muco-adesividade e biodegradabilidade, o quitosano tem sido desenvolvido para uma grande variedade de aplicações biomédicas, incluindo têxteis biomédicos, e sistemas de libertação controlada de fármacos. Possui diversos grupos polares na sua estrutura e pode actuar, em solução, como poliacatião a partir do grupo  $\text{NH}_2$  protonado a  $\text{NH}_3^+$ . (Luna-Bárceñas G. *et al*, 2008; Raafat D. *et al*, 2008; Xu J.H. *et al*, 2008)

O quitosano apresenta vantagens em relação a outros agentes microbianos devido às já referidas boas propriedades de biodegradabilidade e baixa toxicidade nas células dos mamíferos. Actualmente, reconhece-se que a actividade biológica do quitosano depende do seu peso molecular, grau de desacetilação, modificação química, grau de substituição, pH, comprimento e posição do substituto das unidades de glucosamina, e o organismo alvo (Rabea E.I. *et al*, 2008).

Foi aplicado sobre fibras de lã como agente antifeltrante para testar a capacidade de resistência ao encolhimento das fibras de lã, no entanto, dada a actividade anti-microbiana natural do quitosano o tratamento com quitosano confere ao têxtil uma dualidade de comportamento: resistência ao encolhimento, em simultâneo com um efeito antimicrobiano (Gao Y. *et al*, 2008).

Foi igualmente provado, através de alguns estudos preliminares, que o quitosano melhora a absorção de corante pelas fibras (Giri V.R. *et al*, 2009).

#### c) Corantes naturais

Muitas plantas são utilizadas para extracção de compostos naturais, naturalmente usados na síntese fármacos. Contudo, devido ao carácter antimicrobiano associado à capacidade de tingimento de alguns, estes são úteis para aplicação no sector da tinturaria (Han S. *et al*, 2005) (Giri V.R. *et al*, 2009).

Os corantes e pigmentos que possuem actividade antimicrobiana extraem-se não só de plantas, mas também de insectos animais e minerais. A escolha de certos tipos de corante não só vai tingir, como também conferir propriedades antimicrobianas ao tecido (Ristić T. *et al*, 2011).

*Lawsonia inermis* é um género botânico pertencente à família *Lythraceae*. Desta planta é extraído um corante natural. O corante contém um pigmento vermelho-alaranjado, designado de Lawsone. Quimicamente, a molécula de Lawsone é 2-hidroxi-1,4-naftoquinona, mas trivialmente, também é conhecida como ácido henotânico e é o principal componente das folhas de *Lawsonia inermis* (ou *Henna*). O extracto aquoso das folhas de *Henna* tem a capacidade de inibir o crescimento de microrganismos Gram positivos e Gram negativos, assim como os microrganismos que estão envolvidos em infecções provenientes de queimaduras (Giri V.R. *et al*, 2009).

Outros corantes extraídos das plantas *Acácia catechu*, *Quercus infectoria*, ou insectos como *Kerria lacca*, quando aplicados a fibras de lã por processos por esgotamento demonstraram actividade contra um vasto espectro de microrganismos, nomeadamente, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris*, *Bacillus subtilis* (Gupta D. *et al*, 2004, Singh R. *et al*, 2005).

A aplicação de materiais revestidos com extractos deste género em queimaduras pode compensar certas complicações que surgem quando se utiliza material convencional, como os pensos curativos envolvidos por uma camada de nitrato de prata, que provocam manchas e retardam o processo de cicatrização (Giri *et al*, 2009).

#### d) Derivados de plantas (aloé vera, extractos e óleos essenciais de plantas)

Os produtos à base de plantas (aloé vera, óleo de eucalipto, Neem - *Azadirachta indica*, semente de uva e extractos de folhas de Tulsi, etc) representam o maior grupo de substâncias antimicrobianas e são constituídas por substâncias como os fenóis, terpenoides, óleos essenciais, alcalóides, lectinas, polipéptidos e poliacetilenos. Estes compostos possuem não só actividade antimicrobiana mas também antioxidante. Isso é extremamente importante no desenvolvimento de biomateriais inovadores pois fornece, para além de inibição antimicrobiana, a redução de espécies reactivas de oxigénio (Gouveia I.C., 2010; Ristić T. *et al*, 2011).

O *aloé vera* é uma planta com propriedades antimicrobianas contra vários microrganismos, inibindo o seu crescimento. Algodão tratado com extractos de *Aloé vera* pelo processo pad-dry apresentou actividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* e mantém a sua durabilidade durante as lavagens (Gouveia I.C., 2010; Joshi M. *et al*, 2009; Ristić T. *et al*, 2011).

#### e) Mel

O mel tem sido utilizado devido às suas propriedades medicinais desde os tempos antigos e recentemente recuperou a sua importância como remédio natural para o tratamento de feridas infectadas. Tem-se reconhecido que este possui um amplo espectro de actividade antimicrobiana

que se origina a partir de produção de peróxido de hidrogénio, mas a actividade antimicrobiana também é atribuída a mecanismos de acção que envolvem o methyl-glyoxal, o teor de açúcar, alta acidez, o conteúdo de compostos fenólicos e oligopéptidos. Estudos clínicos revelam que pensos de alginato revestidos com mel de castanheiro induzem uma cicatrização mais rápida em feridas infectadas e crónicas. Curativos à base de alginato e mel de castanha já estão disponíveis no mercado e são apropriados para uma ampla gama de tipos de feridas (queimaduras, úlceras venosas da pele, úlceras do pé diabético, úlceras de pressão, feridas infectadas com bactérias resistentes a antibióticos, tais como MRSA e VRE, etc) (Ristić T. *et al*, 2011).

#### f) Aminoácidos (Sericina, Cisteína)

A sericina é uma das proteínas constituintes da seda. Esta proteína tem elevada aplicabilidade em têxteis, actuando como um biomaterial, pois apresenta características antimicrobianas. (Altman G.H. *et al*, 2003 ; Gouveia I.C., 2010; Joshi M. *et al*, 2009; Zhang Y.Q., 2002)

A L-Cisteína é um aminoácido que confere efeito antimicrobiano quando aplicado em materiais têxteis, apresentando uma potencial aplicação em materiais biomédicos. A ligação da L-Cisteína através de pontes dissulfureto entre grupos tiol e as fibras proteicas revelou actividade antibacteriana contra bactérias gram positivas e gram negativas, tendo um efeito duradouro e sem toxicidade para o ser humano. O efeito antibacteriano dos agentes sulfidrilicos (compostos tiolados) está relacionado com a reacção dos grupos sulfidriolo que estão localizados na membrana das bactérias. Não só os resíduos de cisteína, mas também os resíduos de arginina com grupos sulfidriolo livres, desempenham um papel importante na expressão da actividade antibacteriana de alguns péptidos antimicrobianos (Gouveia I. C. *et al*, 2011)

### 1.3 Microrganismos

As bactérias são seres microscópicos com estrutura unicelular e classificam-se morfolologicamente de acordo com a forma da célula e com o grau de agregação. Podem ser organizadas em cocos (esféricas), bacilos (bastonete), vibriões (vírgula) e espirilos (forma ondulada). Relativamente ao grau de agregação, apenas os cocos e os bacilos formam colónias, e estes ordenam-se em diplococos, estreptococos, estafilococos e diplobacilos e estreptobacilos, respectivamente. Podem ser detentoras de apêndices como flagelos, estruturas que lhes permite a locomoção. A maioria das bactérias é heterotrófica, dependendo da matéria orgânica como fonte de carbono (Maillard J.Y., 2002; Prescott *et al*, 2008).



A estrutura da célula bacteriana é a de uma célula procariótica, sem organelos no interior celular, sem um núcleo envolvido por uma membrana nuclear e sem DNA organizado em verdadeiros cromossomas como na célula eucariótica. O DNA dos procariontes, geralmente composto por um único cromossoma circular, encontra-se localizado no citoplasma numa zona chamada nucleóide. Estas células não possuem nenhum tipo de compartimentação interna por membranas. A sua estrutura elementar consiste apenas numa parede celular, uma membrana citoplasmática e citoplasma (Maillard J.Y., 2002).

A parede celular é uma estrutura rígida, que recobre a membrana citoplasmática e confere forma às bactérias. Quimicamente é constituída por peptidoglicanos, ácidos teicóicos, lipopolissacarídeos e proteínas. É essencialmente da responsabilidade da estrutura e composição química da parede celular e membranas envolventes, que surgem variações da sensibilidade das bactérias para determinados tipos de agentes antibacterianos, bem como as respostas geradas por elas (Maillard J.Y., 2002; Prescott *et al*, 2008).

A parede celular das células procarióticas equivale à parede das células eucarióticas vegetais. No entanto, possui componentes exclusivos, como por exemplo, peptidoglicanos. Mesmo dentro do grupo, subsistem diferenças relevantes no que diz respeito à sua ultra-estrutura e composição química e essas diferenças são responsáveis pelo seu comportamento face à coloração de gram (Prescott *et al*, 2008).

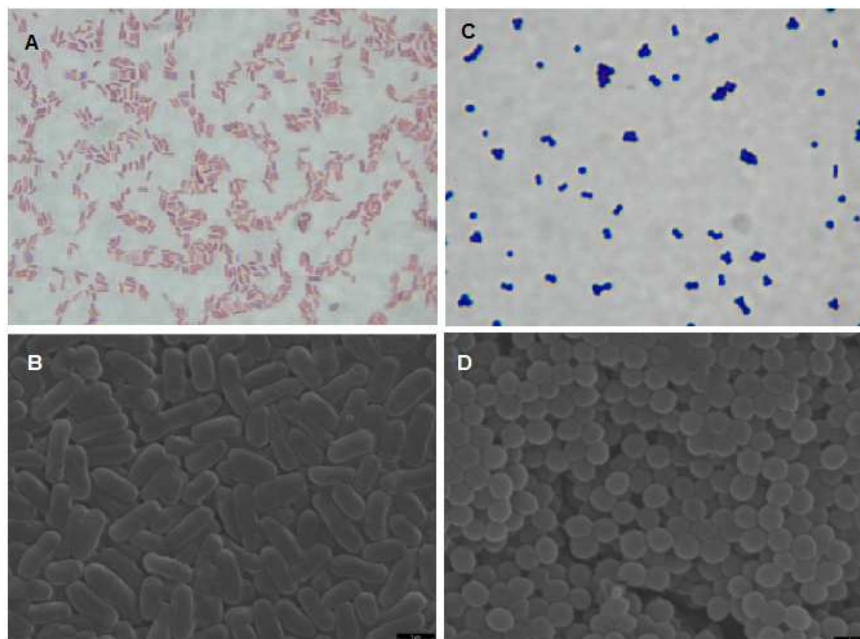
A parede celular das bactérias Gram-positivas, quando observada em microscopia electrónica, apresenta-se como uma estrutura rígida, homogénea e espessa. É predominantemente constituída por peptidoglicanos, mas existem ainda outros polímeros como ácidos teicóicos e teilurónicos. Pelo contrário, e sob o ponto de vista estrutural, a parede das bactérias Gram-negativas exhibe uma maior diferenciação e complexidade e apresenta-se como uma estrutura não homogénea mas sim estratificada. A camada mais interna é mais rígida e essencialmente constituída por peptidoglicanos. Possui uma camada mais externa, ausente na parede das bactérias Gram-positivas designada de membrana externa; esta membrana é constituída por lipopolissacarídeos, fosfolípidos e proteínas. As bactérias Gram-negativas são, geralmente, menos sensíveis a bactericidas que as Gram-positivas devido à presença desta membrana externa que é responsável pela resistência intrínseca destes microrganismos para compostos antimicrobianos (Maillard J.Y., 2002; Prescott *et al*, 2008).

A membrana citoplasmática é considerada como o principal alvo dos agentes antimicrobianos, pois esta desempenha na célula procariota muitas das funções vitais à sua sobrevivência, que na célula eucariota são efectuadas pelos organelos celulares ausentes nas procariotas. Para além disso, realiza também funções ligadas à biossíntese de componentes da parede celular e funções

bioenergéticas, e funciona como barreira selectiva de permeabilidade (Maillard J.Y., 2002; Prescott *et al*, 2008).

As estirpes bacterianas estudadas neste trabalho são *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) (figura 1.3), previamente descritas na literatura na maioria dos testes de avaliação de actividade antimicrobiana de têxteis bioactivos, pois são as mais comuns em infecções hospitalares e também as que mais degradam os materiais têxteis.

Muitos microrganismos que causam doenças no ser humano fazem parte da sua flora natural. Na pele humana encontram-se maioritariamente bactérias Gram-positivas, como as espécies *Staphylococcus*. As bactérias Gram-negativas, como a *Escherichia coli*, habitam principalmente no intestino grosso. São estas mesmas, as estirpes patogénicas mais comuns nas infecções hospitalares (Borkow G. *et al*, 2008; Murray P.R. *et al*, 2005).



**Figura 1.3:** Imagens de microscopia das estirpes (A) *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e (C) *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) diferenciadas através da coloração de gram; e imagens SEM (x10000) das estirpes (B) *Klebsiella pneumoniae* e (D) *Staphylococcus aureus* (A e C fotografia do autor; B e D adaptado de: Gomes A.P. *et al*, 2010)

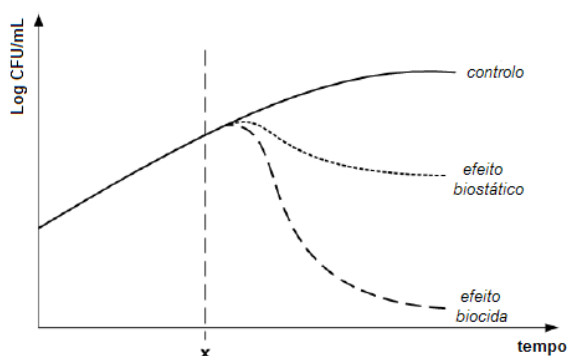
Os *Staphylococcus*, ou estafilococos, são referenciados de cocos pela forma esférica que possuem. Os estafilococos são anaeróbios facultativos, porém, crescem muito mais rápido aerobicamente, sendo capazes de crescer a temperaturas compreendidas entre 18 e 40°C, mas é a 37°C que o seu crescimento é óptimo. Não têm flagelos nem cílios, sendo incapazes de se moverem por si só e são células Gram-positivas (Murray P.R. *et al*, 2005; Prescott *et al*, 2008).

As populações deste género predominam nas regiões da pele ricas em glândulas sudoríparas e folículos pilosos e áreas mais próximas dos orifícios naturais do corpo. As espécies *S. aureus* e *S. epidermidis* predominam sobretudo na mucosa nasal e pele da cabeça, respectivamente (Prescott *et al*, 2008).

A *Klebsiella pneumoniae* é uma espécie de bactéria Gram-negativa, em forma de bastonete. É o mais importante membro do género *Klebsiella*, anaeróbio facultativo, podendo ser encontrada no trato respiratório, trato gastro-intestinal e urinário. Pode causar pneumonia, embora seja mais comum a sua implicação em infecções hospitalares (aparelho urinário e feridas) e, em particular, em doentes imunologicamente deprimidos (Prescott *et al*, 2008).

#### 1.4 Mecanismos de acção dos agentes antimicrobianos

A maioria dos agentes antimicrobianos utilizados para o tratamento de infecções bacterianas pode ser classificado de acordo com seu mecanismo de acção principal.

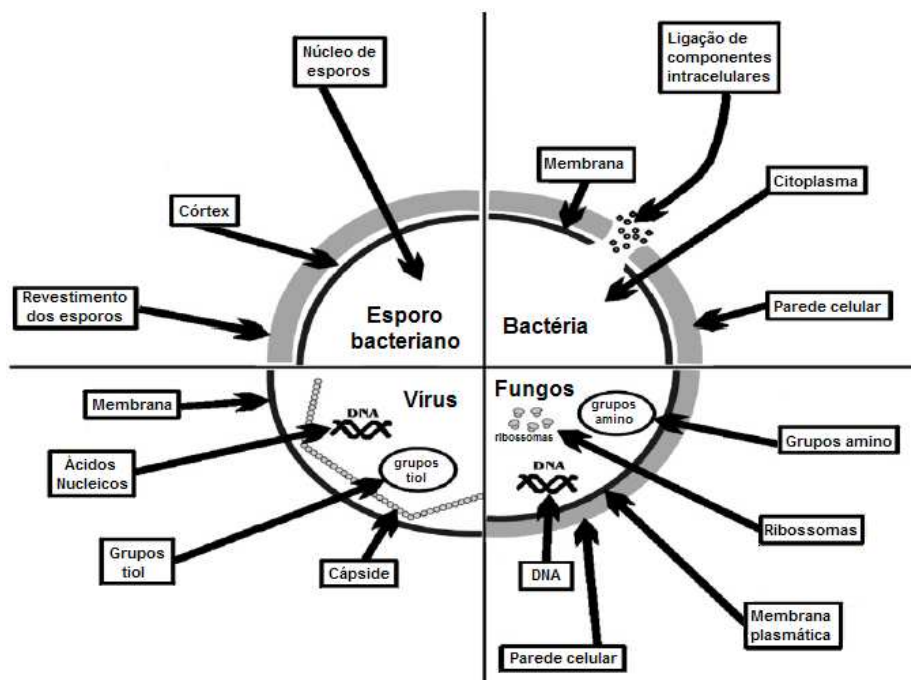


**Figura 1.4:** Efeito biocida/biostático dos agentes antimicrobianos na curva de crescimento de microrganismos (adaptado de: Ristić T. *et al*, 2011)

Em geral, os agentes antimicrobianos podem ter um efeito biocida ou biostático (figura 1.4) sobre o crescimento microbiano. Embora os biocidas (bactericidas e fungicidas) causem a morte dos microrganismos, os biostáticos (bacteriostáticos e fungistáticos) levam à inibição do crescimento dos microrganismos. O modo de acção é dependente da concentração da substância activa e a concentração mínima inibitória (MIC) verifica actividade biostática, enquanto que a concentração mínima letal (MLC) demonstra actividade biocida. Os mecanismos através dos quais as substâncias antimicrobianas afectam o crescimento microbiano são variados e dependem do tipo de agente utilizado. Geralmente, os agentes antimicrobianos impedem a reprodução das células, afectam de alguma forma o metabolismo, provocam danos nas membranas celulares ou na permeabilidade

celular, desnaturam proteínas, tornando a sobrevivência da célula impossível (figura 1.5) (Ristić T. *et al*, 2011).

O mecanismo dos compostos antimicrobianos policatiônicos que têm como alvo as membranas citoplasmáticas dos microrganismos, geralmente ocorre em seis passos: adsorção sobre a superfície da célula microbiana, difusão através da parede celular, ligação à membrana citoplasmática, rompimento da membrana citoplasmática, liberação de componentes citoplasmáticos (como íons  $K^+$ , DNA e RNA) e finalmente morte da célula (Ristić T. *et al*, 2011; Tenover F.C. *et al*, 2006).



**Figura 1.5:** Possíveis locais de acção dos agentes antimicrobianos (Cloete T.E., 2003)

Os agentes antimicrobianos podem agir por contacto, o agente antimicrobiano inibe microrganismos apenas na superfície da fibra (ligação permanente à superfície da fibra); e por difusão, o agente antimicrobiano é lentamente libertado sobre a superfície da fibra ou a partir da sua superfície (libertação controlada de fármacos) (Ristić T. *et al*, 2011).

Agentes antimicrobianos ligados quimicamente à superfície da fibra têxtil onde se forma uma barreira contra microrganismos, controlando a propagação dos microrganismos que entram em contacto com a superfície da fibra. A principal vantagem destes agentes é que eles não libertam compostos dos substratos têxteis para o ambiente, de modo que a probabilidade de desenvolvimento de resistência dos microrganismos é pequena. Como os agentes antimicrobianos ligados estão firmemente ligados à superfície das fibras, então são mais resistentes à lavagem. No

entanto, a durabilidade de lavagem não pode assegurar a sua resistência em relação à função antimicrobiana. Mesmo que o agente antimicrobiano esteja presente na superfície pode perder a sua actividade. A formação de ligações químicas, tais como ligações covalentes, é alcançada sob certas condições que são dependentes dos grupos de ancoragem disponíveis no agente e na estrutura de fibra. A principal desvantagem deste tipo de processo é que ao adicionar agentes activos às fibras, as ligações químicas são formadas entre os grupos funcionais, o que resulta no bloqueio dos referidos grupos funcionais responsáveis pela eficiência antimicrobiana, portanto a actividade antimicrobiana diminui. Uma outra desvantagem deste processo é a utilização de produtos químicos auxiliares e agentes de ligação cruzada que podem não cumprir com os regulamentos de segurança e podem afectar a biocompatibilidade das fibras destinadas para aplicações médicas (Ristić T. *et al*, 2011).

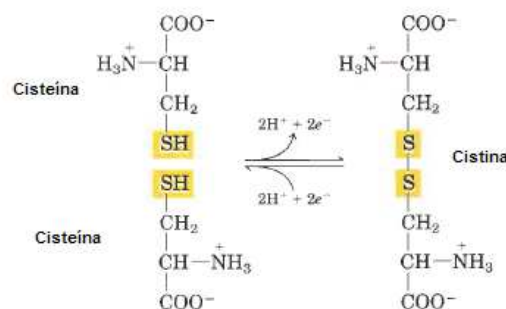
Outro tipo de função química é o mecanismo de libertação controlada de fármacos. Estas substâncias são chamadas de agentes antimicrobianos de impregnação, porque eles penetram sobre a superfície da fibra ou no ambiente envolvente. Uma vez que não estão quimicamente ligados à superfície têxtil e a quantidade de agente a ser libertado é limitada, eventualmente a concentração de agente activo diminui e cai gradualmente para valores abaixo do limite de eficiência, o que pode induzir resistência a estas substâncias em microrganismos. Apesar disso, a libertação do agente pode provocar sérios problemas de saúde e os compostos antimicrobianos podem interferir com a flora residente da pele e causar erupções cutâneas, irritações da pele e alergias, ou até mesmo levar à proliferação de bactérias patogénicas. Os compostos antimicrobianos de impregnação geralmente não resistem a repetidos ciclos de lavagem e a sua libertação em água podem ter um efeito negativo sobre microrganismos necessários no tratamento de águas residuais (Ristić T. *et al*, 2011).

Apesar das muitas propriedades negativas, um agente antimicrobiano de impregnação é desejável, por exemplo quando o agente é incorporado nas fibras e portanto ineficaz a menos que migre para a superfície, ou quando se pretende pensos para cicatrização de feridas em que a penetração do agente é necessária (Ristić T. *et al*, 2011).

## 1.5 Cisteína

A cisteína é um aminoácido polar não carregado e a polaridade dos seus grupos R deve-se aos seus grupos sulfidrílo. Os seus grupos sulfidrílo conferem-lhe propriedades de um ácido fraco, podendo formar ligações de hidrogénio fracas com o oxigénio ou com o azoto. A cisteína é rapidamente oxidada, formando um aminoácido dimérico ligado covalentemente chamado

cistina, onde duas moléculas de cisteína estão unidas por ligações dissulfureto (figura 1.6). Os resíduos dissulfureto que se ligam para dar origem à cistina são altamente hidrofóbicos, não polares. Estas ligações desempenham um papel essencial nas estruturas de várias proteínas através da formação de ligações covalentes entre partes de uma molécula polipeptídica ou entre duas cadeias polipeptídicas diferentes. Este aminoácido está envolvido num grande número de processos metabólicos do ser humano, quer directamente quer pelos seus derivados (Nelson L. D. *et al*, 2008).



**Figura 1.6:** reacção da formação de uma molécula de cistina através da junção de duas moléculas de cisteína por ligações dissulfureto (adaptado de: Nelson L. D. *et al*, 2008)

Como a Cisteína (Cys) é um composto extremamente reactivo, não é de surpreender que afecte várias reacções enzimáticas *in vitro* e um grande número de funções metabólicas em diversos microrganismos. Estes efeitos são responsáveis pela sua citotoxicidade contra microrganismos mas é bastante difícil demonstrar quais as reacções envolvidas na inibição de crescimento, uma vez que os seus mecanismos de acção ainda estão por esclarecer (Kari C. *et al*, 1971).

Os grupos sulfidrílo (SH) da Cys terão uma participação fulcral em muitas reacções enzimáticas. A importância dos grupos SH em funções associadas à membrana, transporte activo e fosforilação oxidativa, são reconhecidas há vários anos. Estes grupos associados a funções críticas da membrana são potenciais locais onde agentes bacteriostáticos e bactericidas se podem direccionar, como por exemplo alguns antibióticos (Fuscina e Nisina) (Morris S.L. *et al*, 1984).

Alguns estudos revelam que os efeitos da Cys sobre microrganismos são semelhantes aos produzidos por omissão de glucose. O que mostra que a Cys provoca inibição de crescimento, depleção de energia, inibição da captação de O<sub>2</sub>, inibição da actividade da citocromo oxidase, bem como efeitos secundários na superfície da célula (Kari C. *et al*, 1971).

## 1.6 Testes antimicrobianos

A actividade anti-microbiana de um agente antimicrobiano é designada de duas formas diferentes, biostática e biocida. Deste modo, os acabamentos antimicrobianos que inibem o crescimento e o desenvolvimento dos microrganismos são designados de biostáticos; pelo contrário, os produtos que destroem por completo os microrganismos são designados de biocidas (Ramachandran T. *et al.*, 2004; Schindler W. D. *et al.*, 2005).

Os testes realizados para verificar a actividade antimicrobiana de produtos têxteis funcionalizados dividem-se em duas categorias, qualitativos e quantitativos, e seguem métodos de procedimento de determinadas normas. Os métodos qualitativos são fundamentados principalmente no teste de difusão em Agar. Estes testes são relativamente rápidos, baratos, simples, mas não apropriados para todos os tipos de tecidos nem para a análise de como diferentes agentes antimicrobianos se difundem através do Agar. Os métodos quantitativos (testes de suspensão) são mais utilizados, mas gastam mais tempo e são mais caros; estes ensaios facilitam a contagem real do microrganismo indicando o nível de actividade bactericida/fungicida. Os testes de suspensão podem ser utilizados em todos os tipos de tecidos e de agentes antimicrobianos, possibilitando comparações entre os diferentes tratamentos antimicrobianos bem como diferentes concentrações aplicadas sobre o mesmo material têxtil (Chun D. T. W. *et al.*, 2008; Gao Y. *et al.*, 2008; Höfer D., 2006; Ristić T. *et al.*, 2011).

### 1.6.1 Teste de difusão em Agar

Os testes de difusão em Agar são qualitativos, de fácil execução e são bastante utilizados como testes para detecção da actividade anti-microbiana e quando o número de amostras a testar é considerável. Este teste estima a actividade anti-microbiana através da inibição do crescimento bacteriano; é possível observar a formação de uma zona de inibição circundante à amostra tratada com o composto antimicrobiano (Gao Y. *et al.*, 2008; Ramachandran T. *et al.*, 2004; Ristić T. *et al.*, 2011).

Para realizar este teste colocam-se as amostras têxteis em placas de Nutrient Agar inoculadas com as bactérias do tipo pretendido. Após incubação a uma determinada temperatura (18-48h, dependendo do microrganismo utilizado), efectua-se análise do crescimento bacteriano directamente por baixo do tecido e da existência ou ausência de zona de inibição. No caso de não existir crescimento sob a amostra têxtil verifica-se que esta possui actividade anti-microbiana. A zona de inibição não é directamente proporcional à eficácia do tratamento antimicrobiano. Os resultados do teste dependem de factores como concentração mínima inibitória (MIC), concentração do agente antimicrobiano no tecido, da temperatura de incubação e de

componentes orgânicos. A taxa de difusão do agente para o inóculo influencia o crescimento da zona de inibição e o seu tamanho indica a eficiência da actividade antimicrobiana ou a taxa de libertação do agente activo. Uma forte fixação do agente ao substrato (p. ex.: formação de ligações covalentes) dificulta a sua difusão para o meio, deste modo é impossibilitada a interacção entre o agente e o microrganismo, impedindo a formação de zona de inibição. A existência de uma zona de inibição não implica necessariamente que os microrganismos estejam mortos, eles podem apenas ter sido impedidos de crescer (efeito bacteriostático). Também pode acontecer que os agentes antimicrobianos se difundam através do Agar em diferentes taxas, que depende igualmente do peso e textura do tecido, por conseguinte a eficácia de diferentes agentes não podem ser comparados (Gao Y. *et al*, 2008; JIS L 1902:2002; Ramachandran T. *et al.*, 2004; Ristić T. *et al*, 2011).

#### **1.6.2 Teste quantitativo (ensaio em suspensão)**

Esta categoria de testes antimicrobianos avalia a eficácia anti-microbiana através da redução da população microbiana, baseando-se na contagem dos microrganismos, sendo portanto um método quantitativo. A actividade anti-microbiana é avaliada através da comparação do tamanho da população inicial com a que permanece após a incubação com o agente antibacteriano (Gao Y. *et al*, 2008; Ramachandran T. *et al.*, 2004).

A concentração bacteriana é ajustada a  $\approx 10^5$  cel/mL, posteriormente pipeta-se para a amostra têxtil um volume conhecido da cultura diluída e leva-se a incubar durante um determinado tempo e a uma certa temperatura (dependendo do microrganismo utilizado). Após o tempo de incubação especificado, retira-se uma alíquota e plaqueia-se em Nutrient Agar; as placas são incubadas durante 18-24h e conta-se o número de colónias. A redução da quantidade de bactérias, no caso de existir, é calculada utilizando a concentração bacteriana inicial e a contagem final após a exposição à amostra funcionalizada. Recomenda-se que uma amostra não tratada (controlo) seja testada em paralelo para assegurar a validade do teste. O teste deve ser executado em triplicado para garantir a reprodutibilidade das condições e validação dos resultados. A introdução de uma percentagem de humidade nos ensaios é essencial para compreender a acção do agente activo, pois nem sempre a morte bacteriana é consequência da capacidade anti-microbiana de um determinado agente mas sim da humidade presente no meio, conferindo assim a impressão de uma falsa eficácia da capacidade anti-microbiana (Gao Y. *et al*, 2008; JIS L 1902:2002; Ramachandran T. *et al.*, 2004; Ristić T. *et al*, 2011).

As normas mais comuns para a determinação da eficácia dos têxteis tratados com agentes antimicrobianos são: AATCC TM100 e TM147, JIS L 1902, ASTM E 2149 e ISO 20743.



Em geral, os métodos de ensaio antimicrobianos devem ser realizados sob condições controladas, padronizados, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados. A precisão dos métodos mencionados depende em grande parte da capacidade de extracção microbiana a partir das amostras têxteis. Devido à grande diversidade de materiais com propriedades próprias, reconhece-se uma grande dificuldade em desenvolver um só teste que consiga satisfazer todas as exigências. Deste modo, muitos laboratórios realizam uma bateria de testes para estudar completamente a actividade de um determinado material têxtil, incluindo métodos como testes de viabilidade, diferentes métodos colorimétricos, microscopia fluorescente e citometria de fluxo. Com uma crescente necessidade de ensaios microbiológicos mais seguros, rápidos e baratos, aumenta também o interesse nas aplicações de novas técnicas. A confiança no teste depende da precisão, exactidão, sensibilidade e medidas que poderiam desenvolver um método que detecta a contagem total viável em tempo real. É de esperar que no futuro da indústria têxtil aumente a procura por testes antimicrobianos confiáveis, especialmente para têxteis usados em aplicações médicas e de higiene (Gao Y. *et al*, 2008; JIS L 1902:2002; Ramachandran T. *et al.*, 2004; Ristić T. *et al*, 2011).

Os testes antimicrobianos só avaliam a capacidade anti-microbiana do material têxtil previamente tratado. No entanto, antes da sua comercialização, estes devem ser submetidos a outro tipo de testes, particularmente de biocompatibilidade, que envolvem três ensaios distintos: citotoxicidade, sensibilidade e irritabilidade (Gao Y. *et al*, 2008).

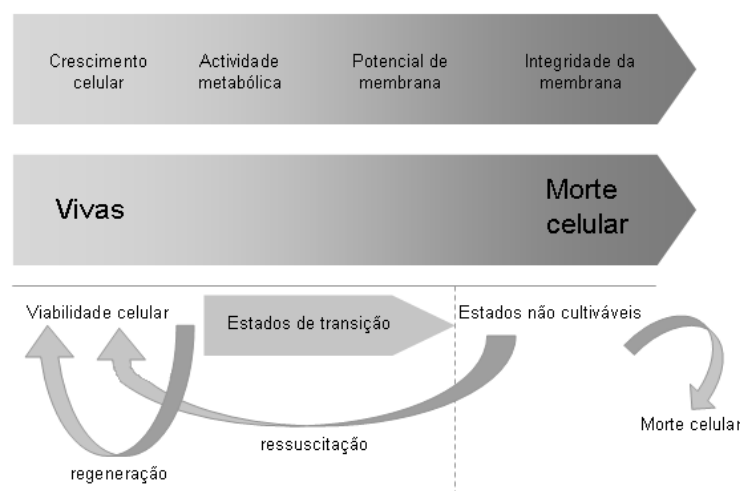
## **1.7 Testes de avaliação de actividade**

Em geral, os métodos de ensaio antimicrobianos devem ser realizados sob condições controladas, padronizadas, a fim de garantir a reprodutibilidade dos resultados. A precisão dos métodos mencionados depende em grande parte da capacidade de extracção microbiana a partir das amostras têxteis. Devido à grande diversidade de materiais com propriedades próprias, reconhece-se uma grande dificuldade em desenvolver um só teste que consiga satisfazer todas as exigências. Deste modo, muitos laboratórios realizam uma bateria de testes para estudar completamente a actividade de um determinado material têxtil, métodos como testes de viabilidade, diferentes métodos colorimétricos, microscopia e citometria de fluxo. Com uma crescente necessidade de ensaios microbiológicos mais seguros, rápidos e baratos, aumenta também o interesse nas aplicações de novas técnicas. A confiança no teste depende da precisão, exactidão, sensibilidade e medidas que poderiam desenvolver um método que detecta a contagem total viável em tempo real. É de esperar que no futuro da indústria têxtil aumente a

procura por testes antimicrobianos confiáveis, especialmente para têxteis usados em aplicações médicas e de higiene (Gao Y. *et al*, 2008; JIS L 1902:2002; Ramachandran T. *et al.*, 2004; Ristić T. *et al*, 2011).

### 1.7.1 Citometria de fluxo

A informação que se pode retirar dos ensaios de viabilidade sobre os estados fisiológicos das células é limitada a dois níveis extremos de actividade metabólica: o saudável, presente em células viáveis com capacidade para se dividirem, e o correspondente a morte celular (figura 1.7). A vantagem da citometria de fluxo em analisar células individualmente consiste na detecção de uma variedade de estados fisiológicos celulares intermédios que realmente existem numa determinada população, mostrando assim a heterogeneidade da população. A citometria de fluxo permite a avaliação da heterogeneidade de culturas microbianas, à escala da célula individual, não ignorando outras ferramentas importantes tais como a microscopia de varrimento confocal e a análise de imagem (Nebe-von-Caron *et al*, 1995; Nebe-von-Caron *et al*, 2000; Porter J. *et al*, 1996; Rieseberg M. *et al*, 2001; Silva F. *et al*, 2010).



**Figura 1.7:** Esquema representativo dos diferentes graus de viabilidade e vitalidade celular (adaptado de: Díaz M. *et al*, 2009)

Por estes motivos, esta técnica tem tido cada vez mais impacto na comunidade científica. O uso dos vários fluorocromos em citometria de fluxo permite a diferenciação de diferentes subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade das células. Esta diferenciação levou a introdução do termo “viável, mas não “culturável”, aplicado a células que não estando metabolicamente activas, também não estão mortas e, evidentemente, não são reveladas através dos ensaios de viabilidade celular. A utilização de critérios do funcionamento celular tais como o potencial da membrana

citoplasmática, o estado metabólico e a integridade da mesma, permitem caracterizar estes estados metabólicos (Nebe-von-Caron *et al*, 2000).

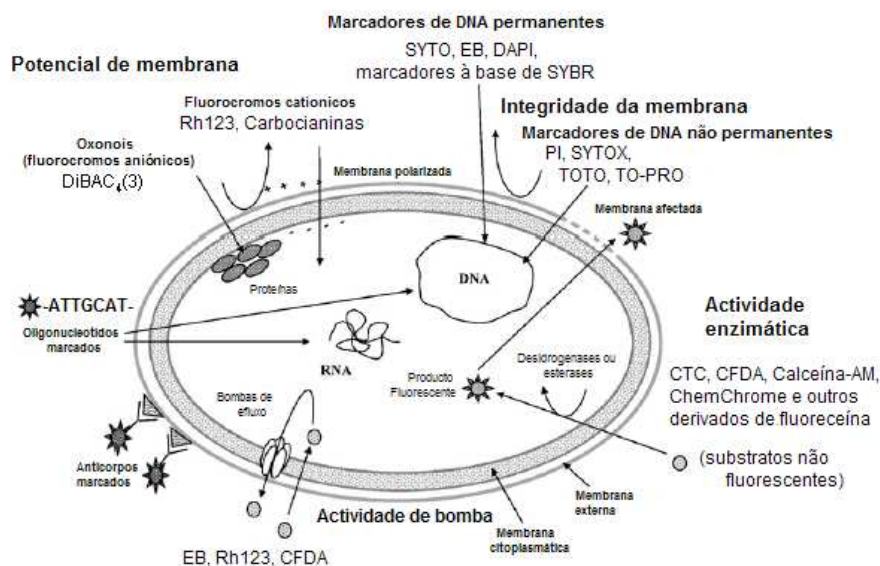
As células de bactérias saudáveis são delimitadas por uma membrana citoplasmática que lhes permite comunicar selectivamente com o ambiente que as rodeia. Os sistemas de transporte activo geram um gradiente electroquímico que é fundamental para o perfeito funcionamento de uma célula saudável. O corante fluorescente brometo de etídio (BE) consegue atravessar uma membrana polarizada, mas só se liga as cadeias do DNA quando a célula não possui um sistema de transporte activo não específico protão/antiporte. Este sistema quando se encontra activo expulsa este fluorocromo da célula. O iodeto de propídio (PI) também se liga as cadeias do ADN, mas não consegue atravessar uma membrana citoplasmática saudável. Bis-oxonol é um corante liofilizado e aniónico que se acumula intracelularmente desde que a célula se encontre despolarizada. A utilização destes corantes permite a diferenciação dos seguintes estados metabólicos funcionais: células saudáveis (com capacidade para se dividirem), “vitais”, intactas e permeabilizadas. Pensa-se que quando uma célula se encontra sob stress, alguns dos sistemas de transporte activo são afectados (células “vitais”), seguindo-se a despolarização da membrana citoplasmática (células intactas) e, mais tarde, a sua permeabilização (mortas). Células sem a membrana citoplasmática intacta não conseguem manter ou gerar o gradiente de potencial electroquímico que origina o potencial de membrana. Além disso, a sua estrutura interna, não estando protegida por uma membrana citoplasmática intacta, encontra-se livremente exposta ao meio ambiente, pelo que estas células acabarão por se decompor. Todas estas etapas conduzem à morte celular (Hewitt C.J. *et al*, 2001; Midgley M., 1987; Nebe-von-Caron *et al*, 1995).

A citometria de fluxo surge como uma técnica consistente e fiável na detecção das verdadeiras percentagens de células viáveis e mortas, numa determinada população de microrganismos e, por vezes, em situações em que a microbiologia clássica não consegue dar qualquer resposta. A detecção de actividade metabólica, reveladora de crescimento associado à divisão celular é de fácil execução. No entanto, pode haver metabolismo mesmo na ausência de crescimento que produza efeitos indesejáveis tais como a degradação de alimentos, a acumulação de toxinas ou a transferência de genes. Em caso de lesões, dormência (estado fisiológico intermédio entre a morte e o metabolicamente activo) ou privação extrema de nutrientes nas células, a actividade metabólica pode não ser facilmente detectável. Nestas circunstâncias, é possível determinar a integridade da membrana através da retenção ou exclusão de corantes (Silva F. *et al*, 2010; Silva T.L. *et al*, 2003).

### 1.7.1.1 Fluorocromos

O uso de fluorocromos fornece informações adicionais sobre a estrutura da célula ou a funcionalidade. A escolha dos fluorocromos a aplicar na citometria deve ter em conta várias propriedades; o comprimento de onda de absorção máxima e de emissão vai determinar as condições de funcionamento de um determinado fluorocromo. As principais características que um fluorocromo deve ter são: ser biologicamente inerte; ter um coeficiente de extinção e um rendimento quântico elevados, isto é, intensidades de fluorescência elevadas quando associados às células de modo que pequenas concentrações de marcador possam ser detectadas no interior da célula; um espectro de emissão estreito para evitar a sobreposição com outros fluorocromos; fotoestabilidade; baixa toxicidade; e solubilidade em água, entre outros (Diaz M. *et al*, 2010).

Existe uma vasta gama de Fluorocromos com uma grande diversidade de aplicações e de vários tipos de células. Alguns fluorocromos ligam-se especificamente a moléculas de células ou componentes (ácidos nucleicos, proteínas e lípidos) amplificando a sua fluorescência, outros acumulam selectivamente em compartimentos celulares ou modificam as suas propriedades através de reacções bioquímicas específicas, em resposta a alterações no ambiente, tais como pH, polarização da membrana (cianinas e oxonóis) ou actividade enzimática (substratos fluorogénicos) (figura 1.8) (Diaz M. *et al*, 2010).



**Figura 1.8:** Fluorocromos, locais alvo na célula e funções a identificar pelos fluorocromos (Diaz M. *et al*, 2010)

A técnica da citometria de fluxo, juntamente com o uso de marcadores fluorescentes, oferece a possibilidade de se efectuar a diferenciação de células muito para além da viabilidade celular, pouco relacionada com a capacidade das células para crescerem e se reproduzirem. Permitindo a

avaliação de propriedades estruturais e/ou funcionais das células, tais como a actividade metabólica, o potencial de membrana e integridade ou a biossíntese de macromoléculas leva a uma profunda caracterização das populações de células. Medições multiparamétricas revelam a presença de estados fisiológicos intermédios entre a vida e a morte celular, mostrando a heterogeneidade inerente às populações microbianas (Diaz M. *et al*, 2010).



## Capítulo 2

### Objectivos

Considerando que, existe a necessidade de se encontrar processos de funcionalização antimicrobiana com efeito permanente, eficaz, não tóxico e ecológico, sobretudo para fibras naturais como o algodão, face à sua vasta aplicação em têxteis hospitalares e de aplicação biomédica;

Os principais objectivos deste trabalho consistem no desenvolvimento de materiais têxteis à base de algodão com propriedades antimicrobianas obtidas por processos biotecnológicos que utilizam L-Cisteína, e no estudo e análise do mecanismo de acção que se desencadeia entre a L-Cisteína e as bactérias, como resposta à capacidade antimicrobiana deste aminoácido.





## Capítulo 3

### Materiais e Métodos

Neste capítulo são expostos os procedimentos utilizados neste trabalho. Refere-se o protocolo utilizado na avaliação do possível efeito da L-Cisteína sobre as estirpes *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, através da detecção da concentração mínima inibitória (MIC) da L-Cisteína na forma livre. A inibição do crescimento e efeito antibacteriano foi verificada de acordo com a Norma JIS L 1902-2002.

São indicados os métodos de preparação e funcionalização do algodão com L-Cisteína, bem como os efeitos resultantes em termos de bioactividade e propriedades do algodão. Para o efeito testou-se a capacidade de ligação da L-Cisteína às fibras de algodão, com e sem pré-activação da sua superfície, processo que consiste na aplicação simples e directa da L-Cisteína às fibras de algodão, por técnicas de esgotamento e impregnação, em equipamentos vulgarmente utilizados em tinturaria e acabamento de têxteis.

De modo a verificar a presença de L-Cisteína nas amostras funcionalizadas recorreu-se a uma adaptação do teste de reagente de Ellman's por forma a ser aplicado directamente em substratos sólidos, e analisou-se a porção de L-Cisteína presente nas amostras tratadas, por comparação com o respectivo controlo. Também se efectuaram análises elementares por Energia Dispersiva de Raios X (EDX), para detecção do enxofre presente na L-Cisteína.

Após funcionalização do material têxtil, as amostras foram submetidas a ensaios de controlo de qualidade, especificamente o ensaio de resistência ao rasgamento, para avaliar o impacto provocado pela imobilização de L-Cisteína no material têxtil, e o ensaio de solidez do acabamento à lavagem, para avaliar a capacidade de fixação permanente do composto sobre a fibra.

Foi estudado ainda o mecanismo de acção da L-Cisteína sobre ambas as estirpes, para tal recorreu-se à técnica de Citometria de fluxo.

Deste modo, o estudo realizado neste capítulo debruçou-se sobre a utilização da L-Cisteína em fibras de algodão para obtenção de resultados que permitam encontrar e validar um método de funcionalização e acabamento antibacteriano aplicável ao algodão, e também identificar o mecanismo de acção deste aminoácido sobre bactérias Gram negativas e positivas.

### 3.1 Materiais

Os reagentes utilizados neste trabalho estão indicados na tabela 3.1, bem assim como a sua caracterização e respectivo fabricante.

**Tabela 3.1:** Reagentes utilizados durante o trabalho experimental

Reagentes	Fórmula química	Marca
L-Cisteína	$C_3H_7NO_2S$	SAFC
Acetato de sódio tri-hidratado	$C_2H_3NaO_2 \cdot 3H_2O$	Riedel-deHaen
Fosfato trissódico dodecahidratado	$Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$	Merck
Ácido acético glacial	$CH_3COOH$	Pronalab
Ácido clorídrico	HCl	Riedel-deHaen
Reagente de Ellman (5,5'-ditiobis (2 ácidonitrobenzoico)) (DTNB)	$C_{14}H_8N_2O_8S_2$	Sigma Aldrich
Ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA)	$C_{10}H_{12}N_2Na_4O_8 \cdot 2H_2O$	Sigma
Ácido cítrico monohidratado	$C_6H_8O_7 \cdot H_2O$	Sigma
TEMPO (2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical)	$C_9H_{18}NO$	Sigma Aldrich
Hipoclorito de sódio	NaOCl	Panreac
Brometo de sódio	NaBr	Sigma
Hidróxido de sódio	NaOH	Panreac
Cloreto de Sódio	NaCl	Panreac
DL-Ditiotreitol (DTT)	$C_4H_{10}O_2S_2$	Sigma
Polysorbate 80 (Tween 80)	$C_{64}H_{124}O_{26}$	Fluka Analytical
Mueller Hinton Broth	-	LiofilChem
Nutrient Broth	-	Fluka Analytical
Nutrient Agar	-	Fluka Analytical
Tryptic Soy Broth	-	Fluka Analytical
Iodeto de Propídio (PI)	$C_{27}H_{34}I_2N_4$	Sigma Aldrich
Bis-Oxonol (BOX) - DiBAC (bis-1,3-dibutylbarbutiric acid)	$C_{27}H_{40}N_4O_6$	Sigma Aldrich
CTC (5-cyano-2,3-ditolyl tetrazolium chloride, dihydrochloride)	$C_{16}H_{14}ClN_5$	Polysciences
DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole)	$C_{16}H_{15}N_5 \cdot 2HCl$	Sigma Aldrich

Na tabela 3.2 estão enumeradas algumas características do equipamento utilizado no decorrer deste trabalho experimental. Foi também utilizado material de uso corrente em laboratório.

**Tabela 3.2:** Equipamento utilizado no decorrer deste trabalho experimental

<b>Designação</b>	<b>Marca</b>	<b>Modelo</b>
Aparelho de tingir	Mathis	BFA12
Foulard	Ernest Benz AG	8153
Balança analítica	Kern	770
Balança analítica	Sartorius	CP225D
Balança	Mettler Toledo	New Classic MS
Centrífuga de eppendorfs	Hettich	Mikro 200R
Centrífuga	Selecta	Mixtasel
Centrífuga de tubos Falcon	Thermo Electron Corporation	Heraeus Multifuge 1S-R
Espectrofotómetro	Datacolor	Spectraflash
Espectrofotómetro	UNICAM	300
Estufa	WTB	Blinder
Autoclave	Advantage Lab	ALO2-03-100
Medidor de pH	Metrohm	744
Medidor de pH	Mettler Toledo	Seven easy
Micropipetas (2-20 $\mu$ L, 20-200 $\mu$ L, 100-1000 $\mu$ L, 500-5000 $\mu$ L)	Socorex, Pipetman, Eppendorf	-
Micropipetas Multicanais (0,5-10, 20-200 $\mu$ L)	Socorex	-
Placa de agitação	Labinco	LD-40
Vórtex	Heidolph	Reax top
Elmendorf Tearing Tester	Thwing - Albert Instrument CO	-
Incubador orbital	Aralab	Agitorb 200
Citómetro	CyanADP	-
Densímetro (medidor de McFarland)	Biomérieux	Densimat

## 3.2 Métodos

### 3.2.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) para a L-Cisteína

A determinação do MIC da L-Cisteína foi realizada de acordo com a norma M7-A6, para as estirpes *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352).

O MIC é definido como a menor concentração de um agente antimicrobiano que impede o crescimento visível de um microrganismo em testes de sensibilidade, sendo que se considera actividade bacteriostática quando existe conservação do número de CFU/mL inicial ou a redução é inferior a 99,9%. Inicialmente neste trabalho, efectuou-se o método da microdiluição em caldo, no entanto devido à instabilidade da L-Cisteína e dificuldade em observar os resultados optou-se pelo método da macrodiluição. A selecção das estirpes para este trabalho foi feita de acordo com as estirpes referenciadas na norma JIS L 1902:2002 como as adequadas para a realização de ensaios antimicrobianos em fibras têxteis.

#### a) Método de microdiluição em caldo

O teste de micro diluição é realizado em placas poços (96 poços).

O inóculo foi preparado fazendo uma suspensão directa, em água estéril, de colónias seleccionadas de uma placa de Agar com 18-24h (fase de crescimento exponencial dos microrganismos). A suspensão foi ajustada de modo a que a sua turbidez coincidisse com a de uma solução padrão de 0,5 na escala de McFarland, que corresponde a  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL para bactérias.

A suspensão de trabalho foi preparada adicionando 10 µL da suspensão bacteriana a 990µL de meio Mueller Hinton Broth (MHB), obtendo-se uma concentração final de  $1-2 \times 10^5$  CFU/mL. A partir de uma solução de L-Cisteína, de concentração inicial de 28mg/mL, fizeram-se sucessivas diluições volumétricas na proporção de 1:2.

Em cada poço colocou-se 50µL de suspensão de trabalho com 50µL de solução de L-Cisteína, nas suas diferentes concentrações. Colocou-se a incubar na estufa estática a 37°C, após 18-24h de incubação efectuou-se a leitura visual do crescimento.

Após a leitura dos MIC, procedeu-se à determinação da concentração mínima letal (MLC). A concentração mínima letal é definida como a menor concentração de agente activo capaz de matar um inóculo bacteriano, sendo que se considera actividade bactericida quando existe morte em 99,9%.

Para proceder à determinação das MLC, retirou-se 100µL da suspensão presente em cada poço e colocou-se uma gota em placas contendo meio Nutrient Agar. Colocou-se a incubar na estufa estática a 37°C e terminadas as 18-24h de incubação, efectuou-se a contagem do número de colónias que cresceu em cada placa.

Este procedimento foi reproduzido em duplicado para ambas estirpes, e efectuaram-se as réplicas necessárias até se chegar a três ensaios concordantes no valor do MIC.

#### b) Método de macrodiluição

O teste de macrodiluição foi realizado em tubos de vidro estéreis. O inóculo foi preparado fazendo uma suspensão directa, em água estéril, de colónias seleccionadas de uma placa de Nutrient Agar com 18-24h (fase de crescimento exponencial dos microrganismos). A suspensão foi ajustada de modo a que a sua turbidez coincidisse com a de uma solução padrão de 0,5 na escala de McFarland, que corresponde a  $1-2 \times 10^8$  CFU/mL para bactérias.

A suspensão de trabalho, de concentração final de  $1 \times 10^5$  CFU/mL, foi preparada a partir da suspensão bacteriana diluída por duas vezes consecutivas: a primeira diluição na proporção de 1:100 e a segunda diluição na proporção de 1:20. A solução de L-Cisteína foi preparada com uma concentração inicial 0,1g/mL, e a partir desta fizeram-se sucessivas diluições sempre na proporção de 1:2.

Devido à observação de precipitado de L-Cisteína, possivelmente pela sua instabilidade em água, efectuou-se uma série de ensaios onde foi introduzido na solução inicial de L-Cisteína o Ditiotreitól (DTT), pela sua capacidade de estabilização. Como este composto apresenta uma elevada toxicidade efectuaram-se controlos, do seu efeito nos microrganismos, com diferentes percentagens de composto (0,2, 0,3 e 0,4%) acrescentados à solução inicial de L-Cisteína.

A cada tubo de vidro adicionou-se 1mL da suspensão de trabalho e 1mL da solução de L-Cisteína com 0,2% de DTT, nas suas diferentes concentrações. Colocou-se a incubar na estufa estática a 37°C, após 18-24h de incubação efectuou-se a leitura visual do crescimento.

Após a leitura dos MIC, procedeu-se à determinação da concentração mínima letal (MLC). Para proceder à determinação das MLC, retirou-se 100µL da suspensão presente em cada poço e colocou-se uma gota em placas contendo meio Nutrient Agar. Colocou-se a incubar na estufa estática a 37°C e terminadas as 18-24h de incubação, o número de colónias que cresceu em cada placa foi contado.

Este procedimento foi reproduzido em duplicado para ambas estirpes, e efectuaram-se as réplicas necessárias até se chegar a três ensaios concordantes no valor do MIC.

### 3.2.2 Funcionalização do Algodão

Para a biofuncionalização dos materiais têxteis em estudo neste trabalho (o Algodão) optou-se pelas técnicas de esgotamento e de impregnação, como métodos para aplicação simples e directa da L-Cisteína às fibras de algodão. Devido à cristalinidade do algodão, os grupos hidroxilo presentes na superfície das microfibrilas encontram-se ligados entre si a partir do hidrogénio, impedindo deste modo a ligação de novas moléculas às fibras do algodão. Assim sendo em alguns dos ensaios de funcionalização procedeu-se à quebra das ligações entre átomos de hidrogénio por meio de reacções químicas, reacção de oxidação. A reacção de oxidação mediada pelo 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl radical (TEMPO) foi a seleccionada para alterar quimicamente a superfície das fibras celulósicas, de acordo com o procedimento descrito por Gomes A.P. *et al* (2010) e Fukuzumi H. *et al* (2010). Quando as fibras celulósicas são oxidadas pelo TEMPO os grupos Hidroxilo do Carbono 6, exposto à superfície da fibra, são convertidos em Carboxilato de Sódio. As fibras de celulose oxidadas são convertidas em nanofibrilas individuais, por desintegração mecânica na água.

Este passo, com aplicação apenas em amostras têxteis de algodão, possibilitou a formação de compostos com carga, de modo a facilitar a ligação da L-Cisteína aos constituintes das fibras celulósicas durante o processo de biofuncionalização.

#### a) Activação da superfície do algodão

Procedeu-se à preparação de uma solução com 0,0125% (m/v) de TEMPO e 0,125% (m/v) de Brometo de sódio (NaBr), adicionou-se à solução anterior 3,2% (v/v) de Hipoclorito de sódio (NaOCl). Mediu-se o pH da mistura e acertou-se, com HCl 0,5M ou NaOH 0,5M, para o pH final de 10,5.

Para uma razão de banho de 1/25 mergulharam-se as amostras (previamente lavadas, secas e ajustadas ao peso de 5g) e deixaram-se por um período de tempo de 30 ou 60 minutos, sob agitação e à temperatura ambiente.

Concluído o período de activação da superfície do algodão, e antes das amostras terem sido retiradas do banho, mediu-se e acertou-se novamente o pH do banho para pH 7. As amostras foram lavadas com água destilada e sob agitação, por um período de 15 minutos, de acordo com

o procedimento descrito por Gomes A.P. *et al* (2010) e Fukuzumi H. *et al* (2010). Após a lavagem, as amostras de algodão são submetidas ao processo de funcionalização escolhido.

#### b) Biofuncionalização de materiais têxteis por esgotamento

Esta técnica permite a aplicação do agente bioactivo durante a fase de acabamento dos materiais têxteis. Estipularam-se parâmetros de avaliação, devido à sua elevada influência na capacidade de absorção da L-Cisteína pelos materiais têxteis, como a temperatura, o tempo de funcionalização, o pH da solução de banho de incubação, parâmetros sobejamente conhecidos dos acabamentos têxteis, e a percentagem de L-Cisteína sobre peso de fibra (SPF).

Para solução do banho de funcionalização, as soluções de L-Cisteína foram preparadas em duplicado com diferentes concentrações e a partir de dois solventes distintos, acetato de sódio e água destilada. Preparou-se uma solução de acetato de sódio ( $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{Na}$ ) de concentração 50mM e ajustou-se o pH, ao valor pretendido, com ácido acético glacial.

**Tabela 3.3:** Combinações de condições experimentais de funcionalização por esgotamento

	Pré-activação da superfície do algodão	T (°C)	t (minutos)	Solução de banho	pH solução de banho	Rotações por minuto
Algodão	30min	80	60	Acetato de sódio	3,7	15
	1h	80	60	Acetato de sódio	3,7	15
	1h	80	60	Água destilada	5,6	15
	1h	80	120	Água destilada	5,6	15

Em cada tubo devidamente identificado, colocou-se uma solução de L-Cisteína e mergulhou-se uma amostra têxtil. Colocou-se a incubar no aparelho de tingir da Mathis, por um período de tempo, temperatura e rotações por minuto pré-definidos (tabela 3.3). No final da incubação, procedeu-se ao enxaguamento de todas as amostras, com água destilada, seguida de secagem  $\pm 37^\circ\text{C}$  durante aproximadamente 4h.

### c) Biofuncionalização de materiais têxteis por impregnação

Para este trabalho adoptou-se como técnica de impregnação da L-Cisteína às fibras têxteis, pelo método de PAD-BATCH, processo realizado a frio. Também esta técnica permite a aplicação do agente bioactivo durante a fase de acabamento dos materiais têxteis.

A solução do banho de funcionalização, as soluções de L-Cisteína, foi preparada a partir de dois solventes diferentes, acetato de sódio e água destilada, e algumas das amostras foram pré-tratadas com reagente TEMPO. Foram preparadas soluções de L-Cisteína com concentração de 13,88g/L e de 69,4g/L, que correspondem a uma percentagem de 1 e 5% de L-Cisteína sobre o peso de fibra, respectivamente. Mergulharam-se as amostras nas soluções de L-Cisteína e fizeram-se passar pelos cilindros do Foulard. Foi pré-definida uma taxa de impregnação de 70%, e por fim colocaram-se as amostras em rotação contínua por um período de 24h.

No final da incubação procedeu-se ao enxaguamento das amostras com água destilada, seguida de secagem  $\pm 37^{\circ}\text{C}$  durante aproximadamente 4h. Todos os ensaios foram realizados em duplicado.

### 3.2.3 Avaliação da eficácia da funcionalização

Para averiguar a eficácia do processo de funcionalização efectuaram-se alguns ensaios que permitem determinar a presença de grupos tiol, e consequentemente L-Cys, nas amostras funcionalizadas. Os ensaios efectuados nesta tarefa foram o ensaio do reagente de Ellman, para determinação quantitativa dos grupos tiol livres presentes nas amostras, e análise elementar por Energia Dispersiva de Raios X (EDX), para averiguar a presença de grupos S nas amostras de algodão.

a) Ensaio do reagente de Ellman (determinação qualitativa dos grupos tiol livres presentes nas amostras)

O ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzoico), também conhecido como DTNB, é um corante que ao reagir com os grupos sulfidrilo livres presentes numa solução aquosa emite uma coloração amarelo/alaranjada (ácido 2-nitro-5-thiobenzoico). Deste modo, o reagente de Ellman é muito útil para a determinação e quantificação destes grupos, devido à sua especificidade de reacção para grupos -SH. O DTNB reage com os grupos sulfidrilos livres, dando origem a duas moléculas: um composto dissulfídrico e um composto corado, o ácido 2-nitro-5-thiobenzoico ou TNB



Os grupos sulfidrílos podem ser estimados por comparação com uma curva padrão, formada por concentrações conhecidas de um composto que contenha o grupo sulfidrílo, como por exemplo a L-Cisteína. No entanto, o procedimento do protocolo *Ellman's Reagent* é limitado para soluções aquosas. Desta forma foi necessário fazer algumas adaptações ao método de forma a ser possível a sua aplicação directa num meio sólido como as amostras de algodão.

Com este ensaio pretende-se avaliar qualitativamente a porção L-Cisteína que se fixou ao algodão aquando do processo de funcionalização. Para tal efectuou-se a análise dos grupos tiol livres sobre os tecidos, uma coloração amarela mais intensa revela uma maior presença de grupos tiol livres, ligados às fibras.

Predefiniu-se uma proporção de 0,2g de corante por cada 60mL de solução fosfato (0,02M), o corante foi dissolvido, no volume de incubação previamente definido, numa solução de fosfato de sódio. De seguida acertou-se o pH da solução corada, até um valor de 7,1, com ácido clorídrico (1M).

O processo consistiu na incubação das amostras tratadas e respectivos controlos, usando as seguintes condições: razão de banho de 1/60 (1g de amostra para 60mL de solução), temperatura de incubação de 60°C e 80°C, durante 45 minutos e com uma agitação constante de 15rpm, para ambas as temperaturas.

No final da incubação, as amostras foram lavadas em água destilada para retirar o excesso de corante e colocadas na estufa a 30°C durante 4 horas.

#### b) Análise por EDX (Energy-dispersive X-ray spectroscopy)

Este ensaio foi realizado para comprovar a existência de grupos S (enxofre), e por consequência de L-Cisteína, nas amostras funcionalizadas. As amostras foram analisadas no Centro de óptica da Universidade da Beira Interior com a colaboração da Eng<sup>a</sup>. Ana Paula Gomes.

Analisaram-se amostras funcionalizadas com 3, 5 e 7% de L-Cys e o controlo sem qualquer tratamento. Cortaram-se quadrados com cerca de 0,5cm de lado e colaram-se aos suportes apropriados para análise de amostras por EDX. Efectuou-se a análise elementar por Energia Dispersiva de Raios X (EDX) das amostras de algodão funcionalizadas com L-Cisteína por esgotamento. O detector utilizado nestas amostras é da marca Rontec e está acoplado ao microscópio electrónico de varrimento da marca HITACHI (modelo S-2700).

### 3.2.4 Ensaios de controlo de qualidade das amostras funcionalizadas

De modo a verificar se as amostras funcionalizadas mantêm a resistência inicial, e se após a funcionalização o composto adicionado às fibras resiste à lavagem as amostras foram submetidas a ensaios de controlo de qualidade. Especificamente o ensaio de resistência ao rasgo, para avaliar se a imobilização de L-Cisteína no material têxtil altera as suas propriedades físicas, e o ensaio de solidez do acabamento à lavagem, para avaliar a capacidade de fixação permanente do composto sobre a fibra.

#### a) Ensaio da solidez à lavagem

O efeito permanente da funcionalização bioactiva do algodão foi atestado recorrendo a ensaios de solidez à lavagem. De facto, grande parte dos agentes antimicrobianos não resiste bem a lavagens posteriores. Desta forma, para que este processo se mostre eficaz efectuou-se este procedimento antes da avaliação do efeito antibacteriano de forma a garantir que a L-Cisteína presente nas fibras se encontra ligada quimicamente, e não apenas retida fisicamente nas fibras de algodão garantindo, assim, a durabilidade do acabamento.

Este ensaio permite normalmente avaliar a solidez dos corantes aplicados nos têxteis à lavagem, ensaio realizado de acordo com a Norma ISO 105-C06:1997. No entanto o recurso a este método standardizado, ligeiramente adaptado para o caso em específico, permite garantir se a L-Cisteína se encontra ligada quimicamente às fibras de algodão.

Para este ensaio é necessário cortar amostras têxteis funcionalizadas com 10x4cm, colocaram-se as amostras têxteis funcionalizadas num recipiente com uma solução de sabão Standard previamente preparada e aquecida à temperatura de cerca de 40°C, por um período de tempo de 30 minutos sob agitação mecânica constante. Concluído o tempo de lavagem, procedeu-se ao enxaguamento das amostras com água destilada e secagem das mesmas na estufa a 30°C, até obtenção de massa constante.

Após este tratamento, o material tratado encontra-se em condições de ser avaliado quanto às suas propriedades bioactivas e à qualidade do algodão.

#### b) Ensaio de resistência ao rasgo

De modo a detectar alterações ao nível da resistência física, fizeram-se ensaios de resistência ao rasgo às amostras com e sem tratamento, para posterior comparação. Para a realização destes ensaios efectuaram-se algumas adaptações à Norma ISO 13937-1:2000, estes ensaios foram realizados com um pêndulo de balística (elmendorf tearing tester).

As amostras foram preparadas de acordo com especificações da Norma e colocadas, uma a uma, centralmente no suporte. Após a amostra se encontrar fixada no suporte efectua-se um

corde com uma lâmina que existe no aparelho. De seguida, solta-se o pêndulo que vai rasgar a amostra, esse rasgo é efectuado com uma determinada força, e quando este regressar à posição inicial tem de ser parado.

A força necessária para efectuar o rasgo na amostra é calculada fazendo a relação entre o peso do pêndulo de balística e o valor que ficar marcado na escala do respectivo pêndulo.

### **3.2.5 Avaliação do efeito antimicrobiano**

O efeito antimicrobiano das amostras têxteis funcionalizadas foi testado com base na norma Japonesa *Industrial Standard* JIS L 1902:2002. A avaliação do efeito antimicrobiano das amostras funcionalizadas foi efectuada através de dois testes descritos na norma: um qualitativo (teste de difusão em Agar) e outro quantitativo (teste em suspensão), ambos com aplicação sobre as duas estirpes seleccionadas para este trabalho.

#### **a) Teste de difusão em Agar**

Este ensaio tem como objectivo determinar qualitativamente o potencial efeito bacteriostático e/ou bactericida avaliado através do desenvolvimento de colónias bacterianas no respectivo meio. O princípio deste ensaio tem como base o contacto directo das amostras têxteis com uma suspensão de células absorvida em Nutrient Agar.

Preparou-se uma suspensão bacteriana fazendo uma suspensão directa de colónias seleccionadas de uma placa de Nutrient Agar com 18-24h, em meio Nutrient Broth-A/Tryptic Soy Broth e colocou-se a incubar numa estufa à temperatura de 37°C. Procedeu-se à preparação das amostras têxteis até 2,8x2,6cm, como indicado na norma.

Ajustou-se a concentração da suspensão de trabalho para uma concentração final de  $1 \times 10^6$  -  $1 \times 10^7$  CFU/mL. Retiraram-se 100µL da suspensão de trabalho para cada placa de petri com Nutrient Agar e efectuou-se o espalhamento.

As amostras têxteis funcionalizadas foram colocadas sobre a placa com o meio e o inóculo. Colocaram-se as placas a incubar numa estufa a 37°C por 18-24 horas, e procedeu-se à contagem do número de colónias que cresceu em cada placa. Este procedimento foi efectuado para ambas estirpes.

A existência do halo à volta da amostra têxtil após incubação indica que o agente em estudo possui efeito bactericida, e o seu diâmetro de inibição pode ser quantificado a partir da seguinte fórmula:

$$W = \frac{T - D}{2}$$

Onde W é o diâmetro do halo de inibição, T e D o diâmetro total da amostra e zona de inibição em mm, e largura da amostra em mm, respectivamente. É de salientar, no entanto, que não é obrigatória a existência de halo, para descrever a actividade anti-bacteriana de um têxtil.

#### b) Teste quantitativo

Este ensaio tem como base a determinação quantitativa, pelo princípio do contacto com uma suspensão de células, do potencial efeito bacteriostático e/ou bactericida das amostras funcionalizadas.

Prepararam-se amostras têxteis com  $\approx 0,4g$ , 6 amostras controlo (sem agente em estudo) e 6 amostras funcionalizadas de cada concentração do agente em estudo, por cada bactéria a testar. Dessas amostras 3 foram usadas para medir o número de bactérias vivas depois da inoculação ( $T_{0h}$ ) e as outras 3 após o teste de incubação ( $T_{24h}$ ).

Preparou-se uma cultura bacteriana em suspensão, retirando um pouco de cultura bacteriana de uma placa de Nutrient Agar e suspendendo em Nutient Broth; incubou-se num incubador orbital a  $37^{\circ}C$  por 18-24h com 110rpm. Ajustou-se a concentração bacteriana a  $1-2 \times 10^8$  cel/ml em Nutriente Broth, equivalente a 0,5 na escala de McFarland, e de seguida fizeram-se as diluições necessárias para ajustar a concentração bacteriana até  $1 \pm 0,3 \times 10^5$  cel/ml usando Nutient Broth.

Colocou-se cada pedaço de amostra num tubo de Falcon de 50mL, retirou-se 200 $\mu$ L do inóculo previamente preparado e inoculou-se cada amostra. Os tubos  $T_{24h}$  incubaram por 18-24h a  $37^{\circ}C$ , nos tubos  $T_{0h}$  adicionaram-se 20mL de NaCl 0,85% com surfactante e ‘vortexou-se’.

Retiraram-se 900 $\mu$ L dos tubos  $T_{0h}$  para eppendorfs (diluição  $10^0$ ), retiraram-se 100 $\mu$ L da diluição  $10^0$  e adicionaram-se 900 $\mu$ L de NaCl 0,85% (diluição  $10^{-1}$ ) e retiraram-se 100 $\mu$ L da diluição  $10^{-1}$  e adicionaram-se 900 $\mu$ L de NaCl 0,85% (diluição  $10^{-2}$ ), antes de retirar os 100 $\mu$ L de cada eppendorf homogeneizou-se com a pipeta.

Retiraram-se 10 $\mu$ L de cada eppendorf (uma gota por diluição) para uma placa de petri e faz-se escorrer as gotas pela placa, deixou-se secar e depois incubou-se a  $37^{\circ}C$  por 24h, foram feitos duplicados para cada amostra (2 placas de petri).

Após as 24h de incubação dos tubos  $T_{0h}$  procedeu-se à contagem do número de colónias presentes nas placas e realizaram-se os cálculos. Repetiu-se o procedimento para os tubos  $T_{24h}$ , com as amostras que foram a incubar.

A percentagem da redução de crescimento foi calculada segundo as seguintes fórmulas:

1. Calcular as CFU através do número de colónias com o acerto da respectiva diluição, fazer a média das contagens

$$\frac{\text{soma nr colónias} \times \text{diluição}}{\text{nr repetições}} = \text{média contagem CFU}$$

2. Fazer o cálculo da concentração para  $T_{0h}$  e para  $T_{24h}$

$$\begin{array}{ll} 10\mu\text{L} \text{ —————} & \text{média da contagem CFU} \\ 1000\mu\text{L} \text{ —————} & C_f \text{ (célula/mL)} \end{array}$$

10 $\mu$ L → total colocado na placa  
1000 $\mu$ L → total no eppendorf

3. Calcular a percentagem (%) de redução de crescimento

$$\frac{T_{0h} - T_{24h}}{T_{0h}} \times 100\% = \% \text{ redução crescimento}$$

$T_{0h} \rightarrow C_f$  antes da incubação  
 $T_{24h} \rightarrow C_f$  depois da incubação de 24h

### 3.2.6 Estudo do mecanismo de acção da L-Cisteína para *S. aureus* e *K. pneumoniae*

O ensaio de verificação dos mecanismos de acção da L-Cisteína sobre cada bactéria foram efectuados com recurso à técnica da Citometria de fluxo, onde é possível quantificar o estado fisiológico da célula através do uso de diversos fluorocromos. Em citometria de fluxo o uso de fluorocromos permite a diferenciação de diferentes subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade das células.

Os efeitos da L-Cisteína na membrana ou nas funções celulares das bactérias foram avaliados recorrendo ao uso de vários fluorocromos: PI (iodeto de propídio) para a integridade da membrana; BOX (Bis-oxonol), ou DiBAC<sub>4</sub>(3) (bis-(1,3-dibarbituric acid)-trimethine oxonol), para o potencial de membrana; CTC (5-cyano-2,3 ditolyl tetrazolium chloride) para a actividade metabólica; e DAPI (4,6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) para contra-marcação de células e possibilitar a diferenciação das células bacterianas do ‘lixo’ do citómetro.

#### a) Curvas de morte para a L-Cisteína

As curvas de morte para a L-Cisteína foram determinadas com o intuito de verificar após quanto tempo de contacto se começa a verificar o efeito da L-Cys sobre as bactérias.

Repicaram-se as duas estirpes para placas de Nutrient Agar e incubaram-se durante cerca de 24h. Inocularam-se as bactérias em Mueller-Hinton Broth (MHB), e puseram-se a incubar no incubador orbital a 37°C, 110rpm, durante cerca de 24h. Após a incubação preparou-se uma suspensão com concentração de células de  $1 \times 10^6$  células/mL.

Prepararam-se os controlos e a amostra em erlenmeyers de 50mL, com um volume final de 5mL. O controlo de crescimento apenas com bactéria e meio, o controlo de solvente com bactéria e o solvente usado na preparação da solução do agente antimicrobiano (0,2% DTT em água estéril), e a amostra com bactéria e o agente antimicrobiano com a concentração que corresponde ao valor do MIC para a respectiva bactéria.

Incubou-se a 37°C, e retiraram-se alíquotas às 0, 1, 2, 4, 6, 8, 24h para fazer a contagem das células viáveis. Para a contagem de CFU, efectuaram-se diluições sucessivas de 1:10 em NaCl 0.85% e plaquearam-se em placas de Nutrient Agar, e incubaram-se a 37°C durante 18-24h.

As curvas de morte foram construídas através da construção de gráficos, “log10 cel/mL” versus “time over 24h”, onde se quantificaram as alterações na concentração bacteriana ao longo do tempo. Pode considerar-se actividade bactericida quando a redução é de 99,9% ( $\geq 3 \log_{10}$ ) do número total de cel/mL inicial do inóculo ( $1 \times 10^6$  células/mL). Considera-se actividade bacteriostática quando existe conservação do número de cel/mL inicial do inóculo ( $1 \times 10^6$  células/mL) ou a redução é inferior a 99,9% ( $\geq 3 \log_{10}$ )

Foram efectuados dois ensaios de citometria diferentes, um com o composto em estudo em suspensão e o outro com o composto incorporado no têxtil.

## b) Citometria de Fluxo

### I. Determinação dos controlos para cada marcador

Antes de se proceder ao ensaio de Citometria em si é necessário determinar os controlos (positivo e negativo) para cada fluorocromo, de modo a poder haver termo de comparação com os resultados do ensaio.

A tabela 3.4 resume as condições das células bacterianas necessárias para a determinação dos controlos respectivos a cada fluorocromo.

**Tabela 3.4:** Condições necessárias para a determinação dos controlos positivos e negativos de cada fluorocromo para as bactérias utilizadas

Fluorocromo	Controlo positivo	Controlo negativo
PI	Morte por calor a 70°C durante 30min	Células em fase exponencial de crescimento
BOX	Morte por calor a 70°C durante 30min	Células em fase exponencial de crescimento
CTC	Células em fase exponencial de crescimento	Morte por calor a 70°C durante 30min

Para o controlo negativo (fluorocromos PI e BOX) e controlo positivo (fluorocromo CTC) pipetaram-se (eppendorfs: 0, 2 e 24h) 100µL da suspensão de  $1 \times 10^7$  cel/mL; e volume de tampão correspondente, de acordo com as tabelas 3.5 e 3.6, até perfazer 1mL.

Para o controlo positivo (fluorocromos PI e BOX) e controlo negativo (fluorocromo CTC) pipetaram-se (eppendorfs: 0, 2 e 24h) 100µL da suspensão de  $1 \times 10^7$  cel/mL; e volume de tampão correspondente, de acordo com as tabelas 3.5 e 3.6, até perfazer 1mL. Coloca-se a 70°C durante 30min para ambas as estirpes.

Para o controlo do surfactante (Tween 80) (fluorocromos PI, BOX e CTC), usado nos ensaios antimicrobianos com têxtil, pipetaram-se (eppendorfs: 0, 2 e 24h): 100µL da suspensão de  $1 \times 10^7$  cel/mL; 2µL de Tween 80; e o volume de tampão correspondente, descontando o volume do surfactante, de acordo com as tabelas 3.5 e 3.6, até perfazer 1mL.

**Tabela 3.5:** Preparação das amostras de citometria para bactérias Gram-negativas

	PBS (µL)	PBS+ 4mM EDTA (µL)	Meio Nutrient Broth (filtrado) (µL)	$1 \times 10^7$ cell/mL (µL)	PI 1mg/mL (µL)	BOX 1mg/mL (µL)	CTC 50mM (µL)	T (°C)	t (min)
Af	900	---	---	100	---	---	---	37	15
PI	890	---	---	100	10	---	---	37	15
BOX	---	897,5	---	100	---	2,5	---	37	15
CTC	---	---	800	100	---	---	100	37 (Agitação)	60

**Tabela 3.6:** Preparação das amostras de citometria para bactérias Gram-positivas

	PBS ( $\mu\text{L}$ )	PBS+ 4mM EDTA ( $\mu\text{L}$ )	Meio Nutrient Broth (filtrado) ( $\mu\text{L}$ )	$1 \times 10^7$ cell/mL ( $\mu\text{L}$ )	PI 1mg/mL ( $\mu\text{L}$ )	BOX 1mg/mL ( $\mu\text{L}$ )	CTC 50mM ( $\mu\text{L}$ )	T ( $^{\circ}\text{C}$ )	t (min)
Af	900	---	---	100	---	---	---	TA	5
PI	890	---	---	100	10	---	---	TA	5
BOX	899,5	---	---	100	---	0,5	---	37	5
CTC	---	---	800	100	---	---	100	37 (Agitação)	60

## II. Avaliação da actividade antimicrobiana de um composto por citometria de fluxo - ensaios usando L-Cys em solução

As duas estirpes bacterianas usadas neste estudo foram incubadas num incubador orbital a  $37^{\circ}\text{C}$ , por 110rpm durante cerca de 24h. Após a incubação preparou-se uma suspensão em solução salina 0,85% com uma concentração de células de  $1 \times 10^8$  cel/mL (aproximadamente 0.5 na escala McFarland), efectuou-se uma diluição com PBS até  $1 \times 10^7$  cel/mL.

Prepararam-se os controlos (ependorfs: 0, 2 e 24h), onde se pipetaram: 100 $\mu\text{L}$  da suspensão de  $1 \times 10^8$  cel/mL; o volume do solvente, utilizado na preparação da solução com o agente antimicrobiano (0,2% DTT em água estéril), correspondente aos valores do MIC; e o volume de água de peptona até perfazer 1mL. Os ependorfs foram a incubar numa incubadora orbital durante os tempos indicados (2 e 24h) a  $37^{\circ}\text{C}$  com 110rpm.

Para as amostras (ependorfs: 0, 2 e 24h) pipetaram-se: 100 $\mu\text{L}$  da suspensão de  $1 \times 10^8$  cel/mL; o volume de agente antimicrobiano correspondente para que a concentração final seja o valor do MIC; e volume de água de peptona para perfazer 1mL. Os ependorfs foram a incubar numa incubadora orbital durante os tempos indicados (2 e 24h) a  $37^{\circ}\text{C}$  com 110rpm.

As suspensões incubadas com agente antimicrobiano e os controlos foram centrifugadas durante 10min a 10.000g, retirou-se 900 $\mu\text{L}$  do sobrenadante e ressuspendeu-se em 700 $\mu\text{L}$  de PBS, obtendo-se assim a suspensão bacteriana.

Pipetou-se para ependorfs estéreis de acordo com as tabelas 3.5 e 3.6.

Para a contagem de CFU (unidades formadoras de colónias) é necessário efectuar diluições sucessivas de 1:10 em NaCl 0.85% até uma diluição final de  $1:10^5$ . Retiraram-se 10 $\mu\text{L}$  de cada uma das amostras de autofluorescência para efectuar a contagem de UFC em placas de Nutrient Agar (fazer duplicado).



Após a incubação às temperaturas e tempos adequados para cada fluorocromo, centrifugou-se a 10.000g durante 5min. Para a *K. pneumoniae* retiraram-se 850µL do sobrenadante e pipetaram-se para cada eppendorf 850µL de PBS, e ressuspendeu-se com o vórtex. Para a *S. aureus* retiraram-se 850µL do sobrenadante e pipetaram-se para cada eppendorf 842µL de PBS e 7,5 µL de DAPI (1mg/mL), e ressuspendeu-se com o vórtex.

Após a incubação da *S. aureus* por 15min a 37°C centrifugou-se a 10.000g durante 5min. Retiraram-se 850µL do sobrenadante e pipetaram-se para cada eppendorf 850µL de PBS, e ressuspendeu-se com o vórtex. Transfere-se o conteúdo dos eppendorfs para tubos de citometria.

### III. Avaliação da actividade antimicrobiana de um composto por citometria de fluxo - ensaios usando os extractos das amostras têxteis

Para a realização deste ensaio efectuou-se uma adaptação à norma JIS L 1902-2002, de modo a conseguir extrair as células bacterianas das amostras têxteis funcionalizadas, e aplicou-se aos procedimentos já conhecidos para citometria de fluxo.

As duas estirpes bacterianas usadas neste estudo foram incubadas num incubador orbital a 37°C, por 110rpm durante cerca de 24h. Após a incubação preparou-se uma suspensão em solução salina com uma concentração de células de  $1 \times 10^8$  cel/mL (aproximadamente 0.5 na escala McFarland), e efectuou-se uma diluição com PBS até  $1 \times 10^7$  cel/mL.

Colocaram-se as amostras têxteis em tubos Falcon de 50mL, retiraram-se 200µL da suspensão bacteriana que foram colocados na amostra têxtil e deixou-se absorver. Após a amostra ter absorvido a suspensão bacteriana adicionaram-se 20mL de solução salina com surfactante (0,85% de NaCl com 0,2% de Tween80) e agitou-se bem, no vórtex, para soltar as células das fibras. Filtrou-se a suspensão através dos filtros de particulados, para eliminar fibras de tecido. Após a filtração colocaram-se 10mL da suspensão resultante num tubo Falcon de 15mL e centrifugaram-se a 5.000g/10min ou a 4.700rpm/10min, retirou-se cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur estéril deixando apenas cerca de 300-500µL de sobrenadante. Adicionaram-se os restantes 10mL de suspensão, voltou a centrifugar-se e após a centrifugação retirou-se cuidadosamente o sobrenadante com uma pipeta de Pasteur estéril deixando apenas cerca de 300-500µL de sobrenadante (suspensão bacteriana).

Pipetou-se para eppendorfs estéreis de acordo com as tabelas 3.5 e 3.6.

Para a contagem de CFU, efectuaram-se diluições sucessivas de 1:10 em NaCl 0.85% até uma diluição final de  $1:10^5$ , e retirou-se 10µL de cada uma das amostras de autofluorescência para efectuar contagem de CFU em placas de Nutrient Agar.

Após incubação às temperaturas e tempos adequados para cada fluorocromo, centrifugou-se a 10.000g durante 5min. Para a *K. pneumoniae* retiraram-se 850µL do sobrenadante e pipetaram-se para cada eppendorf 850µL de PBS, e ressuspendeu-se com o vórtex. Para a *S. aureus* retiraram-se 850µL do sobrenadante e pipetaram-se para cada eppendorf 842µL de PBS e 7,5 µL de DAPI (1mg/mL); ressuspendeu-se com o vórtex.

Após a incubação da *S. aureus* por 15min a 37°C centrifugou-se a 10.000g durante 5min. Retiraram-se 850µL do sobrenadante e pipetaram-se para cada eppendorf 850µL de PBS, e ressuspendeu-se com o vórtex. Transfere-se o conteúdo dos eppendorfs para tubos de citometria.

## Capítulo 4

### Resultados e discussão

#### 4.1 Determinação da concentração mínima inibitória (MIC) para a L-Cisteína

Procedeu-se à determinação do valor de MIC para se poder estabelecer qual a concentração mais baixa de L-Cisteína que inibe o crescimento das bactérias em estudo.

Pelos resultados apresentados na tabela 4.1, verificou-se que o método da microdiluição não é o mais apropriado para a detecção do MIC da L-Cisteína, pois a leitura visual nos poços das placas é bastante difícil devido à existência de precipitado, para as concentrações de 14mg/mL até 1,75mg/mL. A existência de precipitado pode comprometer o possível efeito bacteriostático da L-Cisteína sobre a bactéria pois é possível que haja degradação ou oxidação do aminoácido com a consequente formação de ligações dissulfito que levam à formação de agregados, limitando deste modo a actuação sobre as bactérias.

**Tabela 4.1:** Resultados da determinação da concentração mínima inibitória da L-Cisteína, segundo o método de microdiluição da norma M7-A6, numa solução de 28mg/mL de L-Cisteína (Legenda: + crescimento bacteriano; CC controlo de crescimento)

	14 mg/mL	7 mg/mL	3,5 mg/mL	1,75 mg/mL	$8,8 \times 10^{-1}$ mg/mL	$4,4 \times 10^{-1}$ mg/mL	$2,2 \times 10^{-1}$ mg/mL	CC
<i>Klebsiella Pneumoniae</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>Staphylococcus Aureus</i>	+	+	+	+	+	+	+	+
	+	+	+	+	+	+	+	+

Deste modo procedeu-se à adição de um agente estabilizador, o DTT (Ditiotreitol), e também à substituição do método de microdiluição pelo método de macrodiluição. Mas antes de efectuar o ensaio propriamente dito testaram-se duas concentrações de DTT diferente, 0,2 e 0,4%, para ver se alguma tinha efeito nas células bacterianas, uma vez que o DTT é um agente tóxico. Através dos resultados apresentados nas tabelas 4.2 e 4.3 pode concluir-se que a concentração de 0,2% não tem qualquer efeito sobre o crescimento bacteriano, já a concentração de 0,4% tem efeito bactericida sobre as bactérias, pelo que se optou pela concentração que não causava qualquer dano.

Ao ter-se testado o efeito do DTT sobre as células bacterianas também se verificou que este estabilizava a L-Cisteína, deixando de haver precipitado.

**Tabelas 4.2 e 4.3:** Resultados da determinação da concentração mínima inibitória da L-Cisteína segundo o método de macrodiluição da norma M7-A6, teste com 0,2 e 0,4% de DTT numa solução inicial de 10% de L-Cisteína (Legenda: + crescimento bacteriano; - ausência de crescimento; CC amostra controlo; (c/DTT) com Dithiothreitol, (s/DTT) sem Dithiothreitol)

Solução de 10% de L-Cisteína e 0,2% de DTT					
	50mg/mL (1:1)	25mg/mL (1:2)	12,5mg/mL (1:4)	CC (c/DTT)	CC (s/DTT)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	+	+	+	+
	-	+	+	+	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+
	-	-	+	+	+

Solução de 10% de L-Cisteína e 0,4% de DTT					
	50mg/mL (1:1)	25mg/mL (1:2)	12,5mg/mL (1:4)	CC (c/DTT)	CC (s/DTT)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	-	-	+	-	+
	-	-	+	-	+
<i>Staphylococcus aureus</i>	-	-	+	+	+
	-	-	+	+	+

Seguidamente a ter-se verificado que o DTT não influenciava o crescimento das bactérias procedeu-se à determinação do valor de MIC pelo método da macrodiluição para as duas estirpes. Para este ensaio partiu-se de uma concentração inicial de L-Cisteína de 10% (100mg/mL) com 0,2% (2mg/mL) de DTT, que foi dissolvida em água estéril. Pelos resultados apresentados na tabela 4.4 pode concluir-se que o valor de MIC para a *Klebsiella pneumoniae* varia entre 100 - 50mg/mL, para a *Staphylococcus aureus* varia entre 50 - 25mg/mL, a diferença de valores para as duas estirpes deve-se, possivelmente, ao facto de para a maioria dos agentes antimicrobianos ser mais fácil actuar contra bactérias gram positivas (*S. aureus*) do que contra bactérias gram negativas (*K. pneumoniae*) devido à sua membrana externa.

Os valores de MIC da L-Cisteína determinados neste trabalho são superiores aos determinados por Gouveia I.C. *et al* (2011), 48 - 6mg/mL para ambas as estirpes, possivelmente devido ao facto de a solução mãe de L-Cisteína usada neste preparado ter sido diluída com água destilada estéril o que pode afectar os resultados devidos aos seus efeitos de osmolaridade sobre as bactérias. Estes resultados são ainda significativamente superiores aos determinados

para outros compostos antimicrobianos por outros autores (Cotell A. et al, 2009; Kim Y.H. et al, 2003) 0,05-0,1% (p/v) relativamente ao quitosano (contra *S. aureus* e *K. pneumoniae*) e  $5,3 \times 10^{-6}\%$  (p/v) em relação ao triclosano (contra *S. aureus*). Contudo, a capacidade de a L-Cisteína formar ligações em solução aquosa pode influenciar o facto de ser necessária uma maior concentração pois pode ser necessária uma grande quantidade para que existam grupos sulfidrilo na sua forma livre, necessários para a actividade antibacteriana deste aminoácido.

**Tabela 4.4:** Resultados da determinação da concentração mínima inibitória da L-Cisteína segundo o método de macrodiluição da norma M7-A6 com 0,2% de DTT numa solução inicial de 10% de L-Cisteína (Legenda: + crescimento bacteriano; - ausência de crescimento; CC amostra controlo; (c/DTT) com Dithiothreitol, (s/DTT) sem Dithiothreitol)

	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
50mg/mL (1:1)	- -	- -
25mg/mL (1:2)	+ +	- -
12,5mg/mL (1:4)	+ +	+ +
6,25mg/mL (1:8)	+ +	+ +
3,125mg/mL (1:16)	+ +	+ +
CC (s/DTT)	+ +	+ +
CC DTT 1:1	+ +	+ +
CC DTT 1:2	+ +	+ +
CC DTT 1:4	+ +	+ +
CC DTT 1:8	+ +	+ +
CC DTT 1:16	+ +	+ +

Não foi possível determinar as MLC pois apesar de haver diminuição do crescimento não existe morte, ou uma redução de crescimento de 99,9% do número total de células do inóculo ( $1 \times 10^6$  células/mL). Deste modo pode tirar-se que o efeito da L-Cisteína sobre a *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 4352) e a *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) é apenas bacteriostático, e não bactericida.

## 4.2 Avaliação da eficácia da funcionalização de materiais têxteis

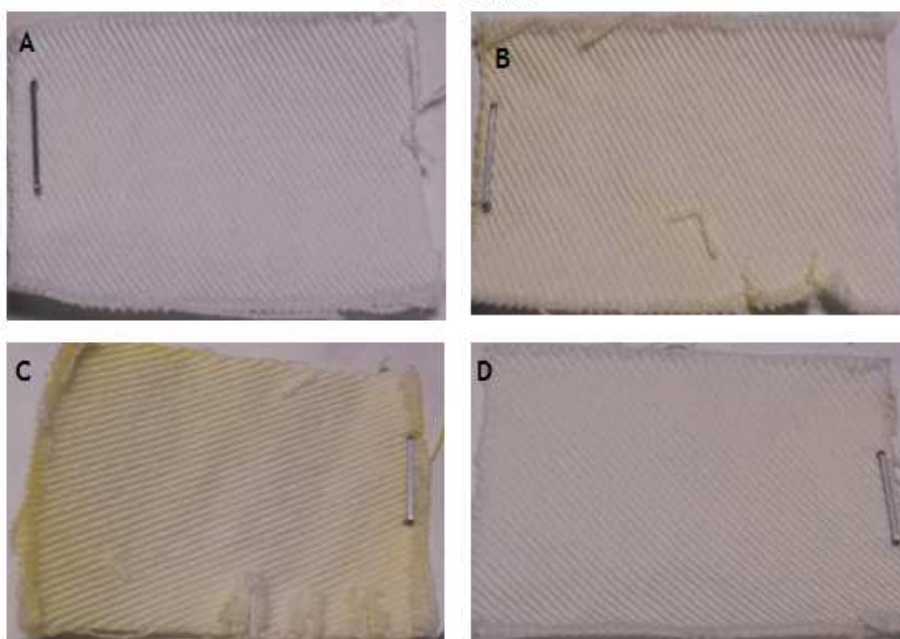
De modo a verificar a eficácia do processo de funcionalização foram efectuados alguns ensaios de controlo de qualidade do processo de funcionalização, nomeadamente, ensaios que permitem determinar a presença de grupos tiol e consequentemente L-Cys nas amostras funcionalizadas; e ensaios de análise elementar por Energia Dispersiva de Raios X (EDX), para averiguar a presença de grupos S (enxofre) nas amostras de algodão.

a) Ensaio do reagente de Ellman (determinação qualitativa dos grupos tiol livres presentes nas amostras)

Os ensaios efectuados nesta tarefa, reagente de Ellman, permitem a determinação qualitativa dos grupos tiol livres presentes nas amostras, e consequentemente a fixação da L-Cys.

Através da análise da figura 4.1 pode observar-se que a amostra A não tem qualquer coloração, como era de esperar pois é a amostra controlo. As amostras B e C apresentam alguma coloração amarela, cor correspondente ao reagente de Ellman, mais intensa na amostra C do que na amostra B o que é compatível com a concentração de L-Cys usada na funcionalização de cada uma das amostras. A amostra D não apresenta coloração significativa, em relação à concentração de funcionalização desta amostra, o que pode ser explicado pelo facto de esta precipitar e assim não se ligar ao algodão, pois já é uma solução mais concentrada, de acordo com os resultados obtidos na funcionalização da lã (Sá D., 2009).

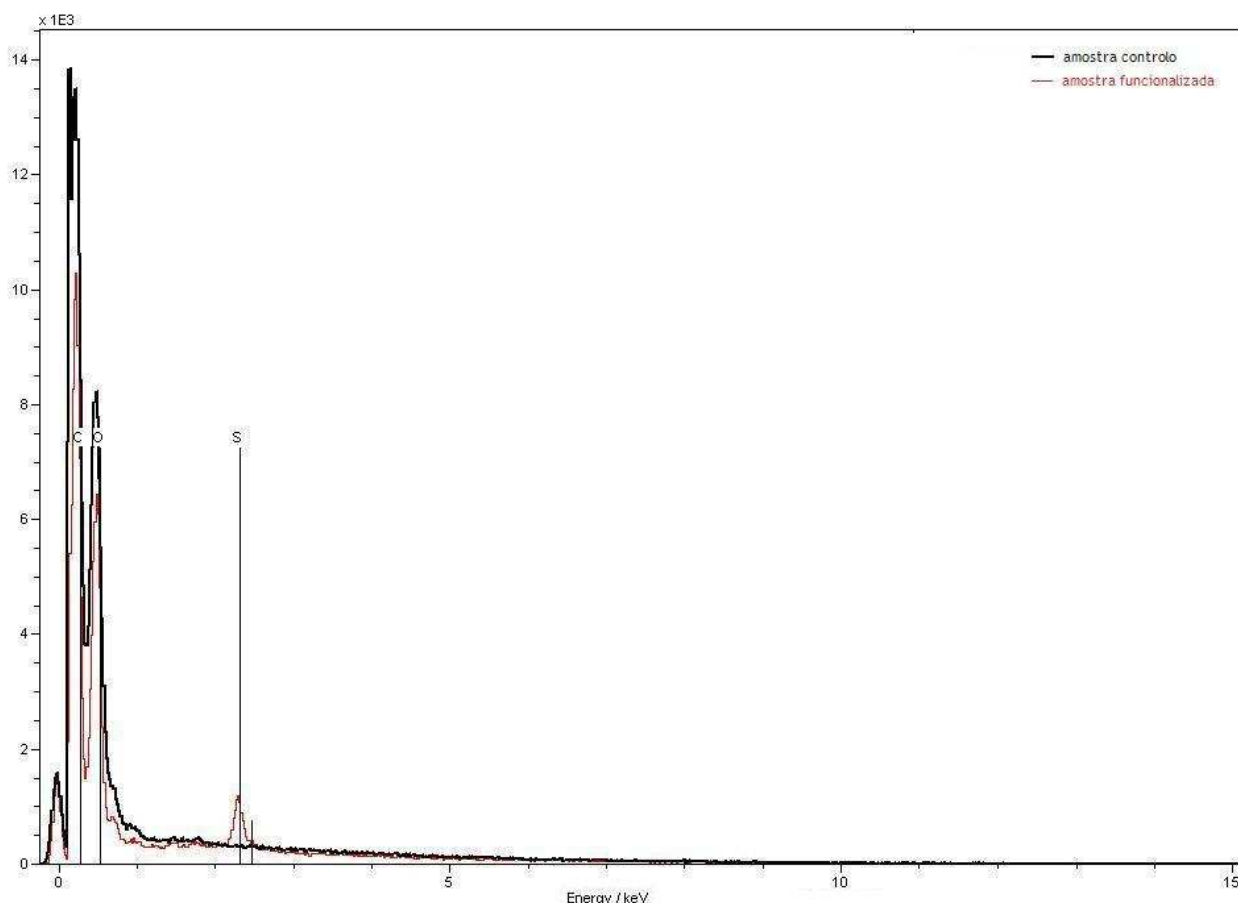
80°C / 45min



**Figura 4.1:** Resultados dos ensaios de Ellman's efectuados a amostras de algodão funcionalizadas com L-Cys a (80°C/60min), o ensaio foi realizado a 80°C durante 45min. (A) amostra controlo; (B) amostra funcionalizada com 3% de L-Cys; (C) amostra funcionalizada com 5% de L-Cys; (D) amostra funcionalizada com 7% de L-Cys (fotografia do autor).

#### b) Análise elementar por Energia Dispersiva de Raios X (EDX)

Efectuou-se uma análise por EDX (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) às amostras de algodão funcionalizadas por esgotamento, a 80°C, com L-Cisteína para verificar se havia presença de grupos S (enxofre) nas amostras. Estas amostras foram posteriormente usadas nos ensaios antimicrobianos.



**Figura 4.2:** Análise EDX (*Energy-dispersive X-ray spectroscopy*) das amostras de algodão funcionalizadas com L-Cisteína  
(Legenda: — amostra controlo; — amostra funcionalizada)

Como é possível verificar através da figura 4.2, existem grupos S nas amostras funcionalizadas com L-Cisteína logo pode-se considerar que existe L-Cisteína fixada nestas amostras. As amostras foram lavadas com água destilada após a funcionalização, deste modo a L-Cisteína presente nas amostras está ligada de forma permanente e não corre o risco de se libertar com o manuseamento durante a preparação dos ensaios antimicrobianos ou na sua utilização final.

### 4.3 Ensaios de controlo de qualidade das amostras funcionalizadas

De modo a verificar se as amostras funcionalizadas mantêm a resistência inicial, e se após a funcionalização o composto adicionado às fibras resiste à lavagem, as amostras foram submetidas a ensaios de controlo de qualidade.

#### a) Ensaio de resistência ao rasgo

Neste ensaio pretende-se verificar-se se o processo de funcionalização das amostras têxteis influenciou a resistência das fibras de algodão. Para tal efectuou-se o ensaio de resistência ao rasgo com um pêndulo de balística, baseado na Norma ISO 13937-1:2000 para avaliar o impacto provocado pela imobilização de L-Cisteína no material têxtil.

De acordo com os factores de conversão fornecidos pelo fabricante do aparelho, efecturam-se os cálculos para converter os valores de resistência ao rasgo fornecidos pelo Elmendorf (*tear force*) para Força em Newtons.

Os cálculos foram efectuados segundo a seguinte fórmula:

$$N = \frac{gf \times 0,00980665 \times \% \text{tear force}}{100}$$

N - força necessária para rasgar o tecido em Newtons

gf - 6400gram-force máxima do pendulo

0,00980665 - factor de conversão de gf para Newtons

% *tear force* - valor em percentagem da força que o pendulo precisou para rasgar o tecido

100 - percentagem máxima

**Tabela 4.5:** Resultados do ensaio de resistência ao rasgo

Ensaios	Força (N)	
	Controlo	Amostras Funcionalizadas
1	0,627	0,627
2	0,627	0,627
3	0,627	0,627
4	0,627	0,627
5	0,627	0,627
6	0,627	0,627
7	0,627	0,627
8	0,627	0,627
9	0,627	0,627
10	0,627	0,627



De acordo com os resultados obtidos e apresentados na Tabela 4.5 pode-se constatar que a resistência das fibras não foi afectada pelo processo de funcionalização, tal como constatado por Sá D. (2009), na funcionalização da lã com este mesmo aminoácido.

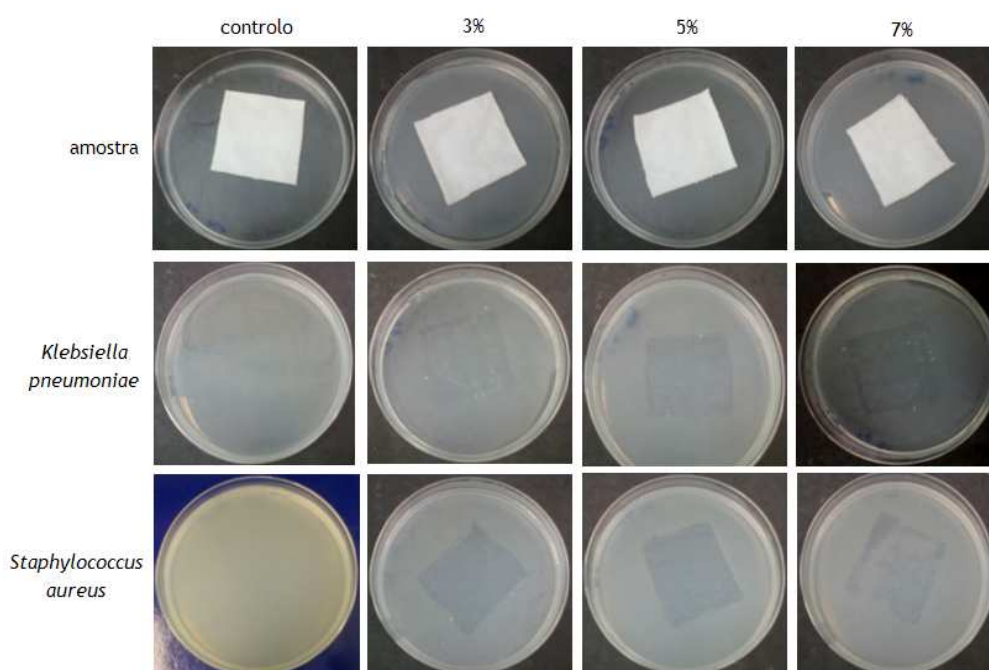
#### 4.4 Avaliação do efeito antimicrobiano

Após os ensaios de solidez do acabamento à lavagem, as amostras lavadas encontram-se em condições de serem avaliadas quanto às suas propriedades antimicrobianas.

Testou-se o efeito antimicrobiano das amostras têxteis funcionalizadas com base na norma JIS L 1902-2002. A avaliação do efeito antimicrobiano das amostras funcionalizadas foi realizada de acordo com dois testes descritos por esta norma: um qualitativo (teste de difusão em Agar) e outro quantitativo (teste em suspensão), ambos com aplicação sobre a *K. pneumoniae* e a *S. aureus*.

##### a) Teste de difusão em Agar

Através deste ensaio antimicrobiano é possível verificar se existe inibição de crescimento bacteriano na zona de contacto com o tecido. Como se pode observar na figura 4.3, nos ensaios efectuados neste trabalho não é visível a formação de halo à volta do tecido (efeito migratório), o que poderá corroborar a hipótese de que o efeito da L-Cisteína é bacteriostático, bem como o carácter permanente no que respeita à fixação da L-Cisteína nos tecidos (não difunde).



**Figura 4.3:** Resultados obtidos nos ensaios de difusão em Agar, com diferentes concentrações, para ambas as estirpes

Uma vez que este ensaio é meramente qualitativo, e no caso de não haver formação de halo não permitir diferenciar a inibição entre diferentes concentrações apenas se realizou no início dos testes antimicrobianos uma vez que nesta situação não permite tirar muitas conclusões.

#### b) Teste quantitativo

Nas amostras activadas com TEMPO durante 30 minutos e funcionalizadas a 80°C durante 60 minutos, cujos resultados são apresentados na tabela 4.6 é possível observar que houve mais crescimento às 24h do que às 0h; estes resultados podem querer dizer que a concentração de L-Cys presente nestas amostras (de 0,05mg/mL a 0,25mg/mL) é demasiado baixa para ter qualquer efeito antimicrobiano, ou também que o pré-tratamento com o reagente TEMPO não foi efectuado durante um tempo suficiente para o algodão adquira as cargas negativas e grupos reactivos para conseguir ligar a L-Cisteína de forma eficaz.

**Tabela 4.6:** Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-tratadas com TEMPO durante 30min e funcionalizadas a 80°C durante 60min, L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio

		Contagem CFU <i>Klebsiella pneumoniae</i>				Contagem CFU <i>Staphylococcus aureus</i>			
		0h		24h		0h		24h	
		10 <sup>0</sup>		10 <sup>0</sup>		10 <sup>0</sup>		10 <sup>0</sup>	
amostras	Dil. CFU/mL								
	Bco	2	3	138	-	54	43	30	+200
	0,25%	12	4	+	133	66	145	+200	+200
	0,5%	6	6	99	165	122	64	134	+200
	0,75%	3	4	+200	19	114	55	+200	+200
	1,0%	3	7	+	8	71	54	+200	4
	1,25%	6	4	1	+	77	68	+200	41

Dados os resultados obtidos neste ensaio procedeu-se a um aumento das concentrações de L-Cys utilizadas nas funcionalizações, e também ao aumento do tempo de pré-tratamento com TEMPO para 1h.

Nos próximos ensaios utilizou-se outro processo de funcionalização, o processo de impregnação durante 24h, realizada a frio. Este ensaio foi realizado para duas concentrações diferentes (0,2mg/mL e 1mg/mL) e com amostras que foram pré-tratadas com TEMPO e com outras sem pré-tratamento.

Nos ensaios correspondentes aos resultados apresentados nas tabelas 4.7 e 4.8 verificou-se que o crescimento para as 24h era inferior ao das 0h. Deste modo procedeu-se ao cálculo da percentagem de redução de crescimento mas, como se pode observar, também houve redução de crescimento nos brancos (amostra sem L-Cys, mas funcionalizada com o solvente) o que leva a crer que o acetato de sódio tem actividade antibacteriana quando aplicado como tampão na funcionalização do algodão. Assim, este ensaio foi considerado não válido já que não permite verificar se existe ou não efeito da L-Cys sobre as bactérias.

**Tabela 4.7:** Teste quantitativo efectuado a amostras de algodão, com pré-tratamento com Tempo por 1h e sem pré-tratamento, funcionalizadas por impregnação durante 24h, L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio, para a *Klebsiella pneumoniae*

	[L-Cys]	t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bco	0h	31,78	$3,18 \times 10^3$	99,83
		24h	0,06	$5,56 \times 10^0$	
	1% (200mg/L)	0h	0,33	$3,33 \times 10^1$	100
		24h	0	0	
	5% (1000mg/L)	0h	0,61	$6,11 \times 10^1$	100
		24h	0	0	
	Bco c/pré-tratamento	0h	1,50	$1,50 \times 10^2$	100
		24h	0	0	
	1% c/pré-tratamento	0h	0,89	$8,89 \times 10^1$	75,00
		24h	0,22	$2,22 \times 10^1$	
	5% c/pré-tratamento	0h	27,61	$2,76 \times 10^3$	100
		24h	0	0	

**Tabela 4.8:** Teste quantitativo efectuado a amostras de algodão, com pré-tratamento com Tempo por 1h e sem pré-tratamento, funcionalizadas por impregnação durante 24h, L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio, para a *Staphylococcus aureus*

	[L-Cys]	t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bco	0h	116,778	$1,17 \times 10^4$	100
		24h	0	0	
	1% (200mg/L)	0h	129,167	$1,29 \times 10^4$	100
		24h	0	0	
	5% (1000mg/L)	0h	170,722	$1,71 \times 10^4$	100
		24h	0	0	
	Bco c/pré-tratamento	0h	42,333	$4,23 \times 10^3$	100
		24h	0	0	
	1% c/pré-tratamento	0h	62,722	$6,27 \times 10^3$	99,65
		24h	0,222	$2,22 \times 10^1$	
	5% c/pré-tratamento	0h	64,556	$6,46 \times 10^3$	100
		24h	0	0	

Nos ensaios cujos resultados estão apresentados nas tabelas 4.9 e 4.10 o processo de funcionalização utilizado foi o de esgotamento, realizado para duas concentrações diferentes (0,2mg/mL e 1mg/mL) com amostras que foram pré-tratadas com TEMPO durante 1h. O tampão para a L-Cisteína utilizado neste ensaio foi o acetato de sódio.

**Tabela 4.9:** Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-tratadas com TEMPO durante 1h e funcionalizadas a 80°C durante 60min (L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio), para a *Klebsiella pneumoniae*

	[L-Cys]	t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	Bco	0h	4,89	$4,89 \times 10^2$	100
		24h	0	0	
	1%	0h	9,89	$9,89 \times 10^2$	100
		24h	0	0	
	5%	0h	3,78	$3,78 \times 10^2$	100
		24h	0	0	

**Tabela 4.10:** Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-tratadas com TEMPO durante 1h e funcionalizadas a 80°C durante 60min (L-Cisteína dissolvida com Acetato de Sódio), para a *Staphylococcus aureus*

	[L-Cys]	t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento
<i>Staphylococcus aureus</i>	Bco	0h	15,389	$1,54 \times 10^3$	98,56
		24h	0,222	$2,22 \times 10^1$	
	1%	0h	10,167	$1,02 \times 10^3$	98,91
		24h	0,111	$1,11 \times 10^1$	
	5%	0h	57,111	$5,71 \times 10^3$	100,00
		24h	0	0	

Como se pode observar pelos resultados apresentados nas tabelas 4.9 e 4.10 o crescimento para as 24h é inferior ao das 0h, deste modo procedeu-se ao cálculo da percentagem de redução de crescimento. Mas tal com nos ensaios de impregnação também se pode observar uma elevada redução de crescimento nos brancos (amostra sem L-Cys, mas funcionalizada com o tampão) o que mais uma vez leva a constatar que o acetato de sódio tem actividade antibacteriana, provavelmente devido à carga positiva que o catião sódio confere às fibras ao ser absorvido no processo de funcionalização. Assim este ensaio também não é válido pois não se pode verificar se existe ou não efeito da L-Cys sobre as bactérias.

Em conformidade, nos ensaios seguintes passou a utilizar-se como solvente da L-Cys apenas água destilada, evitando deste modo a interferência do solvente usado sobre os resultados antimicrobianos.

Os ensaios de funcionalização referentes aos resultados apresentados na tabela 4.11 foram efectuados pelo método de impregnação para apenas uma concentração de L-Cys (1000mg/L), nos quais as amostras funcionalizadas se dividem em dois grupos: as que foram pré-tratadas com TEMPO por 1h e as que não sofreram qualquer pré-tratamento. Após o processo de funcionalização metade das amostras foram lavadas e a outra metade não, para se poder verificar se a lavagem afectava ou não a actividade das amostras e averiguar sobre o carácter permanente da fixação da L-Cisteína às fibras de algodão.

**Tabela 4.11:** Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão funcionalizada por impregnação com L-Cisteína durante 24h (L-Cisteína dissolvida com água destilada),

		<i>Staphylococcus aureus</i>				<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
		t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento	t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento
Am.	Cont	t 0h	75,00	$7,50 \times 10^3$	0	t 0h	5,83	$5,83 \times 10^2$	0
		t 24h	3467	$3,47 \times 10^5$		t 24h	>250	-	
Amostras sem pré-tratamento	Bco s/lav	t 0h	90,00	$9,00 \times 10^3$	0	t 0h	6,33	$6,33 \times 10^2$	0
		t 24h	6200	$6,20 \times 10^5$		t 24h	>250	-	
	5% s/lav	t 0h	68,83	$6,88 \times 10^3$	0	t 0h	3,17	$3,17 \times 10^2$	0
		t 24h	76	$7,62 \times 10^3$		t 24h	>250	-	
	Bco c/lav	t 0h	75,50	$7,55 \times 10^3$	0	t 0h	5,17	$5,17 \times 10^2$	0
		t 24h	2050	$2,05 \times 10^5$		t 24h	>250	-	
	5% c/lav	t 0h	32,00	$3,20 \times 10^3$	0	t 0h	5,33	$5,33 \times 10^2$	0
		t 24h	253,33	$2,53 \times 10^4$		t 24h	>250	-	
Amostras com pré-tratamento	Bco s/lav	t 0h	47,67	$4,77 \times 10^3$	0	t 0h	6,33	$6,33 \times 10^2$	0
		t 24h	3800	$3,80 \times 10^5$		t 24h	>250	-	
	5% s/lav	t 0h	60,67	$6,07 \times 10^3$	85	t 0h	3,83	$3,83 \times 10^2$	0
		t 24h	9,00	$9,00 \times 10^3$		t 24h	2917	$2,92 \times 10^5$	
	Bco c/lav	t 0h	63,67	$6,37 \times 10^3$	0	t 0h	6,00	$6,00 \times 10^2$	0
		t 24h	>250	-		t 24h	>250	-	
	5% c/lav	t 0h	55,67	$5,57 \times 10^3$	0	t 0h	6,33	$6,33 \times 10^2$	0
		t 24h	257	$2,57 \times 10^4$		t 24h	5600	$5,60 \times 10^5$	

Como se pode observar pelos resultados apresentados na tabela 4.11 a lavagem das amostras após a funcionalização altera a bioactividade das amostras funcionalizadas pelo método em causa, pois existe uma redução de crescimento nas amostras com 5% sem lavagem e nas amostras lavadas já não se observa qualquer redução de crescimento.

Através dos resultados obtidos pode-se retirar que o processo de funcionalização a frio não é o mais adequado quando se pretende materiais bioactivos de uso contínuo. Mas é possível que seja uma boa opção para materiais descartáveis (uma só utilização) tais como gazes, pensos e fios de sutura.

No processo de funcionalização por esgotamento cujos resultados são apresentados na tabela 4.12 não se efectuou pré-tratamento com TEMPO, e as amostras foram funcionalizadas a 80°C durante 60 minutos com uma concentração (1mg/mL) L-Cys.

**Tabela 4.12:** Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão funcionalizada com L-Cisteína a 80°C durante 60min, L-Cisteína dissolvida com água destilada

		Contagem CFU <i>Klebsiella pneumoniae</i>						Contagem CFU <i>Staphylococcus aureus</i>					
		0h			24h			0h			24h		
		Dil. CFU/mL			10 <sup>0</sup>			10 <sup>-3</sup>			10 <sup>0</sup>		
Amostras	Controlo	1	1	3	+	+	+	26	14	10	+	+	+
		-	1	-	+	+	+	30	14	12	+	+	+
	Bco	3	1	-	+	+	+	26	22	35	+	+	+
		5	-	1	+	+	+	32	14	28	+	+	+
	5% (1mg/mL)	1	-	1	+	+	+	33	15	30	+	+	+
		1	1	3	+	+	+	34	16	37	+	+	+

Como se pode observar pelos resultados apresentados na tabela 4.12 existe mais crescimento bacteriano às 24h do que às 0h, de tal forma que não foi possível fazer as contagens nas diluições utilizadas, o que nos leva a concluir que este processo de funcionalização e estas condições também não são os adequados.

Nos ensaios seguintes, funcionalizaram-se amostras de algodão com pré-tratamento com TEMPO durante 1h, a 80°C durante 60 minutos e mais uma vez apenas se testou para uma concentração de L-Cys (1mg/mL). A tabela 4.13 mostra os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos para estas condições de funcionalização. Note-se que também se testou o efeito do TEMPO no crescimento bacteriano e verificou-se que este não afecta de qualquer modo o crescimento das bactérias. Nestes ensaios verificou-se uma redução de crescimento de 86,01% para a *Staphylococcus aureus*, apesar de não se ter verificado qualquer redução de crescimento para a *Klebsiella pneumoniae*. Em face dos resultados obtidos, as condições deste ensaio foram repetidas mas com mais concentrações.

**Tabela 4.13:** Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-activadas com TEMPO durante 60min e funcionalizadas com L-Cisteína a 80°C durante 60min, L-Cisteína dissolvida com água destilada

		<i>Staphilococcus aureus</i>				<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
		t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento	t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento
Amostras	Controlo	0h	60	$6,00 \times 10^3$	0	0h	11,83	$1,18 \times 10^3$	0
		24h	>250	-		24h	>250	-	
	Controlo TEMPO	0h	64,16	$6,42 \times 10^3$	0	0h	14,5	$1,45 \times 10^3$	0
		24h	>250	-		24h	>250	-	
	Bco	0h	64,11	$6,41 \times 10^3$	0	0h	11,83	$1,18 \times 10^3$	0
		24h	4916,67	$4,92 \times 10^5$		24h	>250	-	
	5%	0h	48,83	$4,88 \times 10^3$	86,01	0h	9,5	$9,50 \times 10^2$	0
		24h	6,83	$6,83 \times 10^2$		24h	>250	-	

Nos ensaios seguintes testaram-se amostras de algodão funcionalizadas com concentrações de L-Cys de 0,6mg/mL (3%), 1mg/mL (5%) e 1,4mg/mL (7%), as amostras de algodão foram pré-tratadas com TEMPO por 1h e foram funcionalizadas a 80°C durante 60 minutos.

Estes ensaios mostraram uma redução de crescimento para as duas estirpes a concentrações diferentes (tabela 4.14), e também se verifica que houve mais crescimento às 24h do que às 0h nos controlos, o que valida os ensaios. Para a *S. aureus* é visível uma redução de crescimento de 23,08% e de 85,83% para as amostras com 3% e 5% de L-Cys, respectivamente. Para a estirpe *K. pneumoniae* é visível uma redução de crescimento de 48,00% e de 96,67% para as amostras com 3% e 7% de L-Cys, respectivamente. Estes resultados foram considerados muito satisfatórios, comprovando que a activação das amostras com TEMPO é crucial para que se dê uma boa fixação da L-Cys, através de um processo de esgotamento, e seja possível obter novos materiais celulósicos com propriedades antibacterianas.

O facto de não existir qualquer redução de crescimento para as amostras com 7% de L-Cys pode ter a ver com o facto de a esta elevada concentração, haver precipitação e a L-Cys não se ligar às fibras não conferindo assim qualquer actividade a estas amostras.



**Tabela 4.14:** Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-activadas com TEMPO (1h) e funcionalizadas com L-Cisteína a 80°C durante 60min (L-Cisteína dissolvida com água destilada)

		<i>S. aureus</i>				<i>K. pneumoniae</i>			
		t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento	t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento
Amostras	Controlo	t 0h	22,00	2,2x10 <sup>3</sup>	0	t 0h	4,83	4,83x10 <sup>2</sup>	0
		t 24h	5116,67	5,12x10 <sup>5</sup>		t 24h	>250	-	
	3%	t 0h	10,83	1,08x10 <sup>3</sup>	23,08	t 0h	4,17	4,17x10 <sup>2</sup>	48,00
		t 24h	8,33	8,33x10 <sup>2</sup>		t 24h	2,17	2,17x10 <sup>2</sup>	
	5%	t 0h	61,17	6,12x10 <sup>3</sup>	85,83	t 0h	5,00	5,00x10 <sup>2</sup>	96,67
		t 24h	8,67	8,67x10 <sup>2</sup>		t 24h	0,17	1,67x10 <sup>1</sup>	
	7%	t 0h	11,50	1,15x10 <sup>3</sup>	0	t 0h	5,50	5,50x10 <sup>2</sup>	0
		t 24h	14,33	1,43x10 <sup>3</sup>		t 24h	13,33	1,33x10 <sup>3</sup>	

Como os ensaios anteriores mostraram que as amostras em estudo possuíam actividade antimicrobiana, procederam-se a novos ensaios mas desta vez variando o tempo de funcionalização para 120 minutos. Testaram-se amostras de algodão funcionalizadas com concentrações de L-Cys de 0,6mg/mL (3%), 1mg/mL (5%) e 1,4mg/mL (7%).

**Tabela 4.15:** Teste quantitativo efectuado a amostras de Algodão pré-activadas com TEMPO (1h) e funcionalizadas com L-Cisteína a 80°C durante 120min (L-Cisteína dissolvida com água destilada)

		<i>Staphilococcus aureus</i>				<i>Klebsiella pneumoniae</i>			
		t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento	t (h)	Média CFU	cel/mL	% red crescimento
Amostras	Controlo	t 0h	50,00	5,00x10 <sup>3</sup>	0	t 0h	5,17	5,17x10 <sup>2</sup>	0
		t 24h	7283,33	7,28x10 <sup>5</sup>		t 24h	>250	-	
	3%	t 0h	19,83	1,98x10 <sup>3</sup>	33,61	t 0h	6,17	6,17x10 <sup>2</sup>	0
		t 24h	13,17	1,32x10 <sup>3</sup>		t 24h	538,33	5,38x10 <sup>4</sup>	
	5%	t 0h	35,17	3,52x10 <sup>3</sup>	21,33	t 0h	8,00	8,00x10 <sup>2</sup>	87,50
		t 24h	27,67	2,77x10 <sup>3</sup>		t 24h	1,00	1,00x10 <sup>2</sup>	
	7%	t 0h	27,00	2,70x10 <sup>3</sup>	0	t 0h	3,67	3,67x10 <sup>2</sup>	0
		t 24h	28,17	2,82x10 <sup>3</sup>		t 24h	18,17	1,82x10 <sup>3</sup>	

Estes ensaios também mostram uma redução de crescimento para ambas as estirpes a concentrações diferentes (tabela 4.15), e também se verifica que houve mais crescimento às 24h do que às 0h nos controlos, o que valida os ensaios. Para a *S. aureus* é visível uma redução de crescimento de 33,61% e de 21,33% para as amostras com 3% e 5% de L-Cys, respectivamente. Para a estirpe *K. pneumoniae* é visível uma redução de crescimento de 87,50% para as amostras com 5% de L-Cys. Como as percentagens de redução de crescimento são inferiores ou semelhantes às dos ensaios anteriores o método anterior é preferível a este, para além de que como aquele processo de funcionalização é mais curto torna o processo mais rápido e económico.

É possível que a diminuição da percentagem de redução de crescimento para estas amostras se deva ao aumento do tempo de funcionalização, pois é possível que a L-Cys se comece a degradar ao longo do tempo à temperatura de 80°C, tal como observado por Sá D. (2009). A possível causa para as amostras funcionalizadas com 7% de L-Cys não apresentar qualquer redução de crescimento foi apresentada anteriormente, na discussão dos resultados do processo de funcionalização anterior.

A utilização da L-Cys apresenta grandes vantagens em relação a muitos compostos já utilizados no mercado. A principal vantagem deste composto em relação aos agentes sintéticos é que não é citotóxico nem liberta compostos tóxicos para o ambiente, uma vez que sendo um produto natural não apresenta citotoxicidade ambiental (Gouveia I.C. *et al*, 2011). Em relação aos agentes antimicrobianos naturais tem a vantagem de ser resistente às lavagens e mais estável que alguns compostos mais comumente utilizados (Gao Y. *et al*, 2008).

Os valores de redução de crescimento comprovados nos ensaios antimicrobianos efectuados a amostras funcionalizadas a 80°C durante 60min demonstram que a L-Cys (tabela 4.13) possui uma capacidade de reduzir o crescimento das bactérias bastante elevada (85,83% para *S. aureus* e 96,67% para *K. pneumoniae*) para concentrações de L-Cys nas amostras (1mg/mL) bastante inferiores ao valor do MIC para cada estirpe (100-50mg/mL para *Kp* e 50-25mg/mL para *Sa*), o que demonstra que a ligação deste composto às fibras de algodão é bastante eficaz e potencia o seu efeito.

Os efeitos da L-Cys nas amostras de algodão, para a concentração de 5%, sobre a *S. aureus* e a *K. pneumoniae* são bastante semelhantes aos verificados para a *E. coli* em amostras de lã e poliamida tratadas com Ar-2%CF<sub>4</sub>, conforme se pode notar em Canal C. *et al* (2009). Como se pode observar, para a L-Cys as reduções de crescimento são 85,83% para *S. aureus* e 96,67% para *K. pneumoniae*, enquanto que para Ar-2%CF<sub>4</sub> são de 90% na lã e 85% na poliamida para a *E. coli* (Canal C. *et al* 2009). Apesar de este estudo ter incluído a *S. aureus* não são referidos valores de percentagem de inibição para esta estirpe o que leva a crer que os resultados não foram tão bons como para a *E. coli*. No estudo de Canal C. *et al* (2009) também foram efectuados ensaios com amostras de algodão mas os autores verificaram que estas amostras com o tratamento efectuado por eles não possuía qualquer actividade antimicrobiana, o que já é uma vantagem deste trabalho pois verifica-se que existe actividade nas amostras de algodão testadas e também se sabe de estudos anteriores (Gouveia I.C. *et al*, 2011) que a L-Cys também confere bioactividade à lã.

A possível razão para a concentração necessária para promover a inibição bacteriana ser menor, quando o aminoácido se encontra ligado às fibras, deverá residir no facto de os grupos tiol livres se encontrarem disponíveis, conferindo um maior efeito antibacteriano. Por outro lado, em solução o aminoácido poderá formar agregados através da formação de ligações

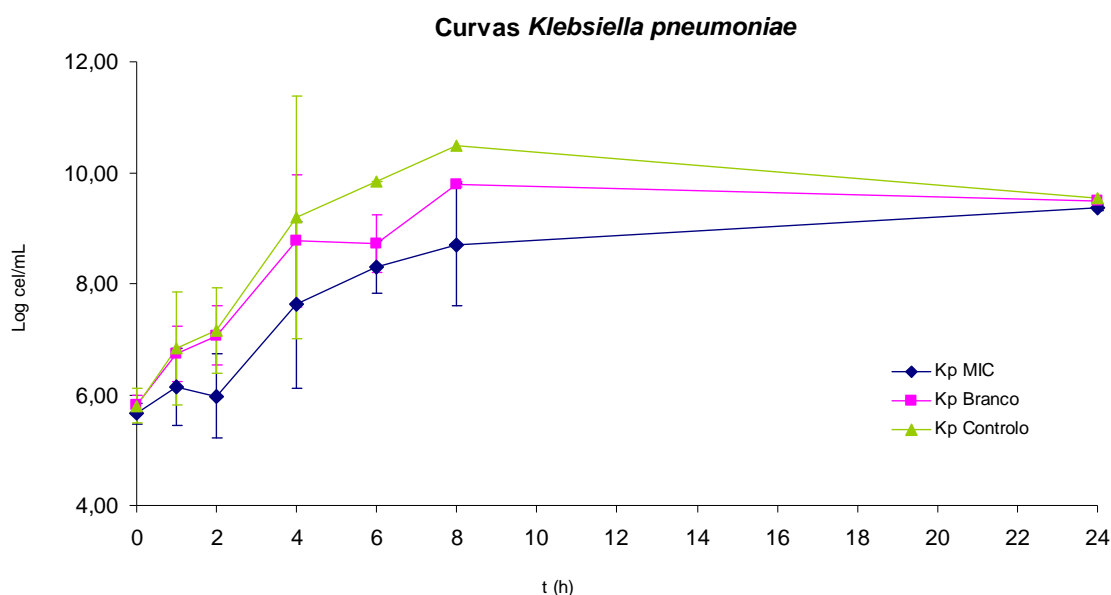
dissulfídricas entre moléculas de L-Cisteína, diminuindo a disponibilidade destes grupos para interagirem com as bactérias, tal como sustentado por Gouveia I.C. *et al* (2011).

#### **4.5 Estudo do mecanismo de acção da L-Cisteína para *S. aureus* e *K. pneumoniae***

O ensaio de verificação dos mecanismos de acção da L-Cisteína sobre cada bactéria foram efectuados com recurso à técnica da Citometria de fluxo, onde é possível quantificar o estado fisiológico da célula através do uso de diversos fluorocromos. Em citometria de fluxo o uso de fluorocromos permite a diferenciação de diferentes subpopulações numa determinada população, correspondentes a diferentes níveis de funcionalidade das células. Antes de se proceder ao ensaio de citometria determinaram-se as curvas de morte para a *S. aureus* e a *K. pneumoniae*, pois de outra forma não seria possível saber ao fim de quanto tempo de contacto é que a L-Cys começava a ter efeito nas células bacterianas.

##### **a) Curvas de morte para a L-Cisteína**

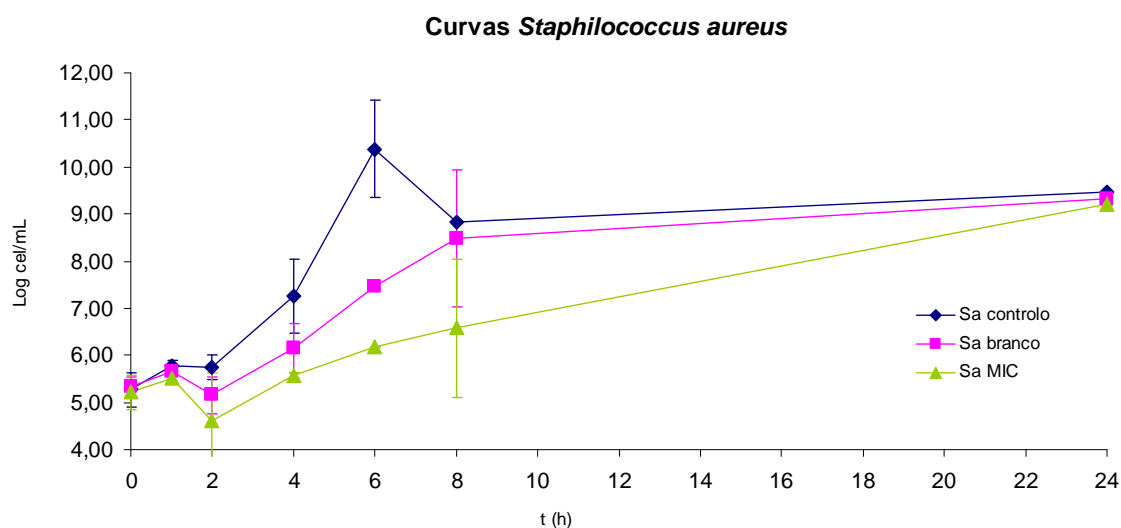
Procedeu-se à determinação das curvas de morte da L-Cys para ambas as estirpes em estudo. As curvas de morte para a L-Cisteína foram estabelecidas com o intuito de verificar após quanto tempo de contacto se começa a verificar o efeito da L-Cys sobre as bactérias. O cálculo das curvas de morte foi efectuado por um período de 24h, e para a sua construção teve-se em consideração as seguintes soluções: o controlo (meio e bactéria), o branco (meio, água com 0.2%DTT e bactéria) e o MIC (meio, cisteína correspondente ao valor do MIC em água com DTT e bactéria).



**Figura 4.4:** Curva de morte para o valor do MIC da L-Cisteína para a *Klebsiella pneumoniae* (controlo: apenas meio e bactéria; branco: bactéria e DTT em quantidade referente ao valor do MIC)

Nos gráficos das curvas de morte (figuras 4.4 e 4.5) é possível observar que não há inibição do crescimento das bactérias (morte). Apenas se pode ver uma diminuição do crescimento, até certo ponto, e depois verifica-se um aumento de crescimento, sendo que às 24h é praticamente semelhante aos dos controlos, onde se pode verificar em ambas as estirpes uma diminuição mais acentuada às 2h de incubação.

Como se pode ver pelos gráficos deixa de haver redução de crescimento às 24h (curva do MIC), isto deve-se possivelmente ao facto de a L-Cisteína se degradar ao longo do tempo, como também acontece com alguns antibióticos e/ou porque ao ser bacteriostático pode permitir o crescimento de algumas bactérias face ao meio rico de cultura.



**Figura 4.5:** Curva de morte para o valor do MIC da L-Cisteína para a *Staphylococcus aureus* (controlo: apenas meio e bactéria; branco: bactéria e DTT em quantidade referente ao valor do MIC)

De facto, neste caso verifica-se, mais uma vez, que o efeito é bacteriostático pois existe conservação do número de cel/mL inicial do inóculo ( $1 \times 10^6$  células/mL). Para se poder considerar a actividade da L-Cisteína sobre as bactérias como bactericida era necessário que a redução fosse de 99,9% do número total de cel/mL inicial do inóculo.

## **b) Citometria de Fluxo**

### **I. Determinação dos controlos para cada marcador**

No início do ensaio de Citometria foi necessário determinar os controlos (positivo e negativo) para cada fluorocromo, de modo a definir as zonas onde cada população se encontra.

Foram escolhidos estes três fluorocromos pois eles identificam as principais alterações nas células bacterianas; a marcação pelo PI identifica morte; a marcação pelo BOX identifica despolarização da membrana; e a ausência de marcação pelo CTC identifica alterações na actividade metabólica.

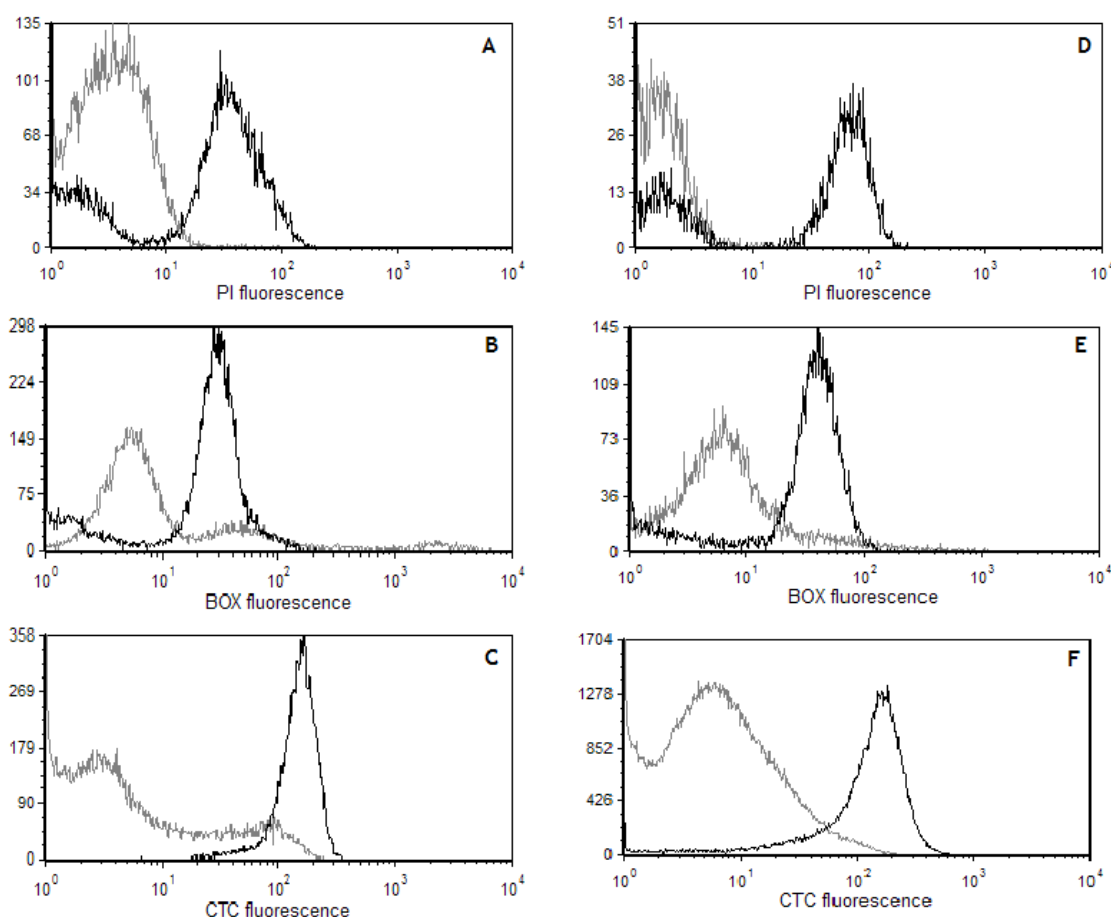
O PI foi utilizado para verificar a integridade membranar das bactérias em estudo, uma vez que se a integridade da membrana estiver comprometida este fluorocromo entra na célula e liga-se aos ácidos nucleicos; caso não haja dano membranar este é excluído pela célula. Escolheu-se o BOX para analisar o potencial de membrana das bactérias, pois as células polarizadas possuem a capacidade de excluir moléculas aniónicas, como o BOX, e células despolarizadas permitem a sua acumulação dentro da célula. Recorreu-se ao uso do CTC para determinar a existência de alterações na actividade metabólica, uma vez que se a actividade metabólica das bactérias estiver intacta estas possuem a capacidade de reduzir o CTC resultando na produção um composto de formazano insolúvel.

Na tabela 4.16 apresentam-se os valores de marcação e de redução de viabilidade dos controlos para os fluorocromos utilizados nos ensaios de citometria de fluxo. O controlo negativo é quando se regista uma percentagem de marcação dos fluorocromos mínima, estado de morte para o PI e para o BOX (alcançado a 70°C durante 30min), e bactérias vivas para o CTC. O controlo positivo é quando se verifica um máximo de percentagem de marcação dos fluorocromos, bactérias vivas para o PI e para o BOX e estado de morte para o CTC (alcançado a 70°C durante 30min). O controlo do surfactante serve apenas para despistar o efeito/fluorescência do surfactante (Tween 80) utilizado nos ensaios com o têxtil.

**Tabela 4.16:** Controlos da percentagem de células marcadas pelos fluorocromos avaliada por citometria de fluxo e da redução de viabilidade avaliada pelo método de contagem em placas

	Controlos	Redução de viabilidade (%)	PI positivo (%)	BOX positivo (%)	CTC positivo (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>c. negativo</i>		0,38	13,74	11,54
	<i>c. positivo</i>	100,0	65,56	75,75	97,39
	<i>c. surfactante</i>	-2,4	0,21	3,49	85,73
<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>c. negativo</i>		1,89	32,36	18,75
	<i>c. positivo</i>	100,0	67,28	71,49	67,13
	<i>c. surfactante</i>	-1087,5	1,96	5,18	87,27

Na figura 4.6 podem ver-se os controlos definidos para os três fluorocromos, para ambas as estirpes.



**Figura 4.6:** Histogramas dos controlos definidos para cada fluorocromo (— controlo positivo; — controlo negativo).

Histogramas (A), (B) e (C) controlos positivo e negativo de cada fluorocromo para a *K. pneumoniae*; (D), (E) e (F) controlos positivo e negativo de cada fluorocromo para a *S. aureus*

## II. Avaliação da actividade antimicrobiana de um composto por citometria de fluxo - ensaios usando L-Cys em solução

A tabela 4.17 mostra os resultados dos ensaios de citometria em suspensão para ambas as bactérias. Os ensaios foram efectuados para o valor do MIC de cada bactéria normalmente efectua-se também para 2 vezes o valor do MIC, sendo que neste caso não foi possível pois o valor de MIC para a *K. pneumoniae* é apenas de metade da concentração da solução mãe preparada para determinar o MIC, a preparação de uma solução de L-Cys com concentração superior (a 100mg/mL) pode afectar a solubilidade do composto.

**Tabela 4.17:** Percentagem de células marcadas pelos fluorocromos avaliada por citometria de fluxo e redução de viabilidade avaliada pelo método de contagem em placas, ensaios realizados às 2h e para o valor do MIC

	Amostras	Redução de viabilidade (%)	PI positivo (%)	BOX positivo (%)	CTC positivo (%)
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	controlo		0,65 ± 0,19	4,20 ± 0,12	94,26 ± 1,77
	MIC	79,88 ± 1,94	0,90 ± 0,55	8,05 ± 0,60	2,62 ± 0,37
<i>Staphylococcus aureus</i>	controlo		2,37 ± 1,18	3,35 ± 0,39	92,12 ± 1,13
	MIC	99,92 ± 0,10	2,33 ± 0,75	7,71 ± 2,10	67,47 ± 6,09

Para a *K. pneumoniae* pode-se concluir que ocorre uma pequena despolarização na membrana (marcação com BOX), aumento de marcação de cerca de 4,20 para 8,05; quanto às alterações na actividade metabólica (marcação com CTC) os efeitos são bastante significativos, há uma redução de marcação de cerca de 94,26% para cerca de 2,62%. Para o PI não existem alterações de marcação suficientes para se considerar qualquer efeito de morte sobre estas bactérias.

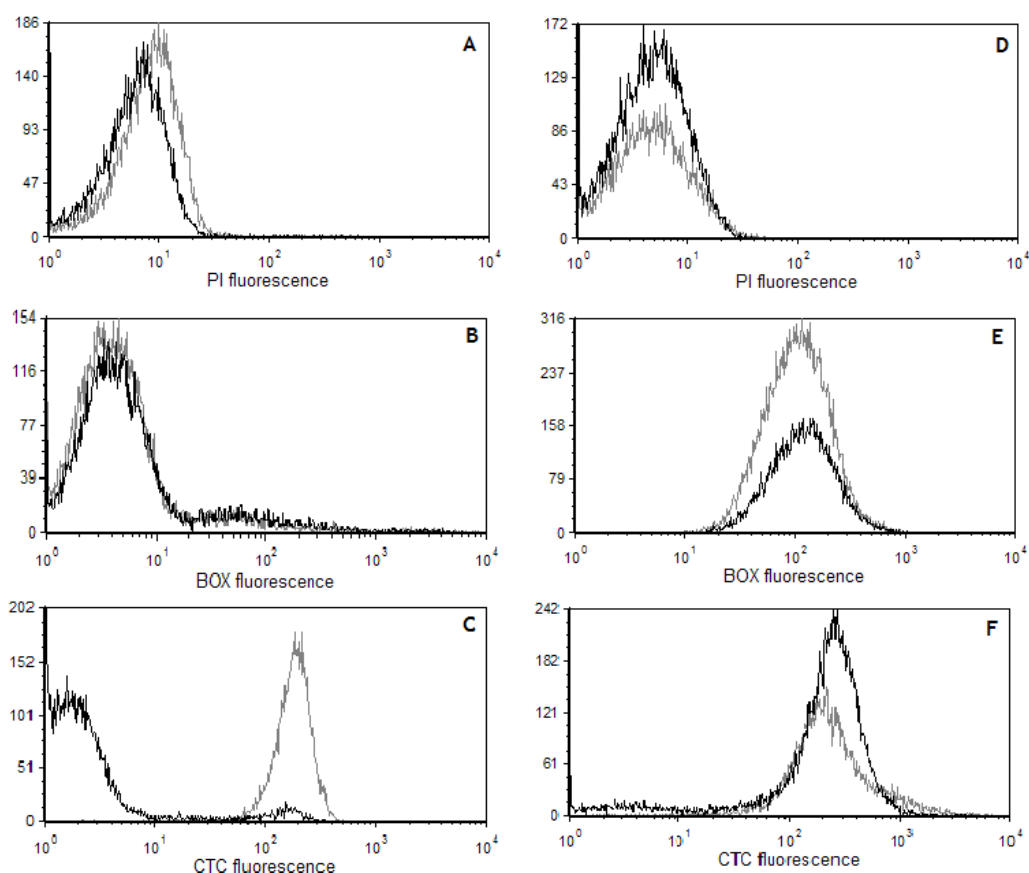
Para a estirpe *S. aureus*, marcação com DAPI, pode observar-se alguma despolarização de membrana, com aumento de marcação de cerca de 3,35 para 7,71; as alterações na actividade metabólica são consideráveis, a redução de marcação é de cerca de 92,12% para cerca de 67,47%, valor inferior ao da redução da *K. pneumoniae*; tal como para a *K. pneumoniae* para o PI não existem alterações de marcação suficientes para se considerar qualquer efeito de morte sobre estas bactérias. Para a *S. aureus* não era possível verificar com certeza a percentagem de marcação para cada fluorocromo, pois devido ao tamanho desta bactéria observou-se que grande parte das células aparecia na zona do 'lixo' do citómetro; deste modo para esta estirpe efectuou-se o procedimento mas com as células marcadas com DAPI, de forma a conseguir-se diferenciar as bactérias do resto dos eventos registados pelo citómetro.

Para a *K. pneumoniae* os valores de percentagem de marcação por PI são inferiores aos verificados na literatura para bactérias gram negativas (Bouhdid S. *et al*, 2010; Bouhdid S. *et al*, 2009; Silva F. *et al*, 2011), 0,9 em comparação com 92,36% para óleo essencial de orégãos, 64,29% para óleo essencial de canela e 72,18% para óleo essencial de coentros, respectivamente, resultados já esperados uma vez que o efeito da L-Cys é bacteriostático. A % de marcação para BOX também é inferior aos valores registados na literatura (Bouhdid S. *et al*, 2010; Bouhdid S. *et al*, 2009; Silva F. *et al*, 2011), 8,05% em comparação com 61,91% para óleo essencial de orégãos, 75,90% para óleo essencial de canela e 93,88% para óleo essencial de coentros, respectivamente. Para o fluorocromo CTC a percentagem de marcação é inferior aos valores registados por Bouhdid S. *et al*, 2009, 2,62% para L-Cys em comparação com 11,74% para óleo essencial de orégãos, e relativamente semelhante aos valores registados por Silva F. *et al*, 2011, 1,70% para óleo essencial de coentros em comparação com 2,62% para L-Cys; o que significa que a redução da actividade metabólica induzida pela L-Cys é superior à registada para estes compostos antimicrobianos.

Para a *S. aureus* os valores de percentagem de marcação por PI são inferiores aos verificados na literatura para esta bactéria (Bouhdid S. *et al*, 2010; Bouhdid S. *et al*, 2009), cerca de 2,33 em comparação com 4,99% para óleo essencial de canela e 8,89% para óleo essencial de orégãos, resultados já esperados uma vez que o efeito da L-Cys é bacteriostático. A percentagem de marcação para BOX é superior aos valores registados na literatura (Bouhdid S. *et al*, 2010; Bouhdid S. *et al*, 2009), cerca de 7,71% para a L-Cys em comparação com 1,72% para óleo essencial de canela e 1,97% para óleo essencial de orégãos; indicando que a despolarização de membrana induzida pela L-Cys é superior à registada para estes compostos antimicrobianos. Para o fluorocromo CTC a percentagem de marcação é superior aos valores registados por estes autores 67,47% para a L-Cys em comparação com 9,89% para óleo essencial de canela e com 17,09% para óleo essencial de orégãos; significando que a redução da actividade metabólica induzida pela L-Cys é inferior à registada para estes compostos antimicrobianos. A redução de viabilidade registada para a *S. aureus* é de 99,92%, valor superior quando comparado com a redução de viabilidade verificada para o óleo essencial de canela e para o óleo essencial de orégãos, 42,86% e 50,48% respectivamente; o que indica que a L-Cys possui um efeito redutor de crescimento bacteriano superior ao destes compostos antimicrobianos, apesar destes serem bactericidas.



Na figura 4.7 podem observar-se os resultados dos ensaios de citometria em suspensão para os três fluorocromos, para ambas as estirpes.



**Figura 4.7:** Histogramas dos resultados dos ensaios de citometria em suspensão, para cada fluorocromo (— controle; — MIC). Histogramas (A), (B) e (C) resultados de cada fluorocromo para a *K. pneumoniae*; (D), (E) e (F) resultados de cada fluorocromo para a *S. aureus*

### III. Avaliação da actividade antimicrobiana de um composto por citometria de fluxo - ensaios usando os extractos das amostras têxteis

Efectuaram-se também ensaios de citometria para células retiradas de amostras têxteis tratadas com L-Cys. Estes ensaios foram efectuados com um tempo de incubação de 24h, pois verificou-se que no têxtil a reacção entre o composto e as bactérias é mais lento do que em suspensão, a diferença dos tempos nos ensaios de citometria em suspensão e com o têxtil deve-se ao facto de o contacto das células bacterianas com o composto em suspensão ser maior do que no têxtil, deste modo é necessário mais tempo de contacto para se poder ver o mecanismo de acção. Também se pode observar que as amostras têxteis têm maior redução de viabilidade com uma menor concentração de L-Cys do que em suspensão.

A tabela 4.18 mostra os resultados dos ensaios de citometria com as células extraídas do têxtil para ambas as bactérias. Os ensaios de citometria com o têxtil foram efectuados para amostras de lã funcionalizadas a 74°C durante 44min e com concentrações de 3,5%, 6% e 8,5%, concentrações com maior percentagem de redução de crescimento para ambas as estirpes, respectivamente. Nestes ensaios escolheu-se usar amostras de lã (Gouveia I.C. *et al*, 2011) por se ter verificado mais fácil a remoção das células a analisar (menor adesão ao têxtil), relativamente às amostras de algodão, nas quais a adesão e absorção são muito elevadas. De realçar, porém, que esta alteração de material de base não afecta o estudo já que o agente antibacteriano é o mesmo, assim como as soluções de funcionalização.

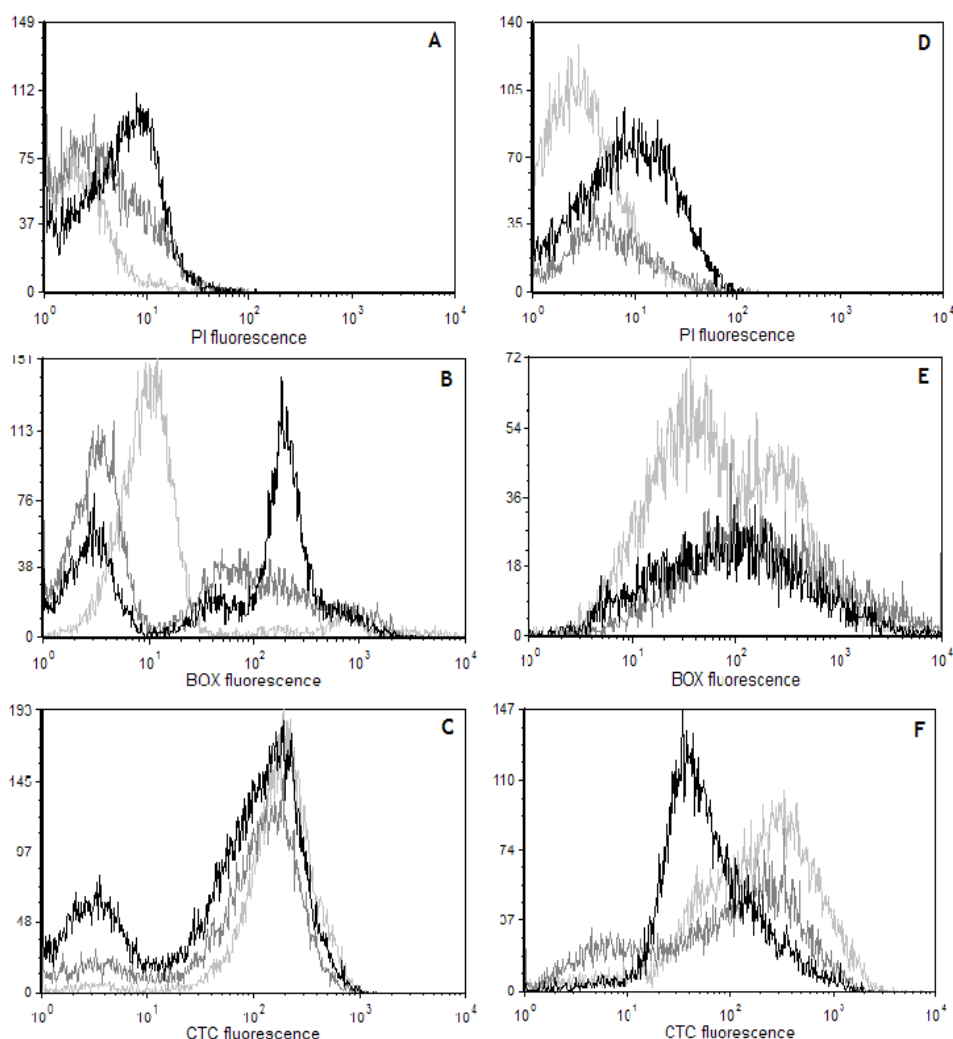
**Tabela 4.18:** Percentagem de células marcadas pelos fluorocromos avaliada por citometria de fluxo e redução de viabilidade avaliada pelo método de contagem em placas, ensaios realizados às 24h com células bacterianas extraídas de amostras têxteis após a incubação

	Amostras	Redução de viabilidade (%)	PI positivo (%)	BOX positivo (%)	CTC positivo (%)
<b><i>Klebsiella pneumoniae</i></b>	<i>controlo</i>		1,32 ± 0,57	6,44 ± 1,80	85,50 ± 4,84
	3,50%	93,99 ± 4,57	3,21 ± 0,93	22,77 ± 8,03	76,90 ± 4,61
	6%	94,98 ± 3,34	1,99 ± 0,66	46,07 ± 5,70	66,95 ± 7,43
<b><i>Staphylococcus aureus</i> (com DAPI)</b>	<i>controlo</i>		2,97 ± 0,91	24,87 ± 6,82	60,08 ± 4,84
	6%	96,80 ± 0,71	4,09 ± 0,01	30,39 ± 3,09	30,40 ± 2,18
	8,5%	96,30 ± 0,85	8,89 ± 7,34	39,38 ± 1,27	32,86 ± 0,37

Pelos resultados apresentados na tabela 4.18, verifica-se que para a *K. pneumoniae* ocorre alguma diminuição da actividade metabólica (marcação com CTC), redução de marcação de 85,5% para 76,9% e 66,95%; alguma despolarização de membrana (marcação com BOX), aumento de marcação de 6,44% para 22,77% e 46,07%; e quase nenhuma morte (marcação com PI), pouca alteração na percentagem de marcação.

Nestes ensaios para a *S. aureus*, segundo a tabela 4.18, verifica-se uma considerável diminuição da actividade metabólica (marcação com CTC), redução de marcação de 60,08% para 30,40% e 32,86%; alguma despolarização de membrana (marcação com BOX), aumento de marcação de 24,39% para 30,39% e 39,38%; e muito pouca permeabilização da membrana, ou morte (marcação com PI), aumento de marcação de 2,97% para 4,09% e 8,89%.

Na figura 4.8 podem observar-se os resultados dos ensaios de citometria para células bacterianas retiradas de amostras têxteis para os três fluorocromos, para ambas as estirpes.



**Figura 4.8:** Histogramas dos resultados dos ensaios de citometria para células bacterianas retiradas de amostras têxteis, para cada fluorocromo (— controlo; — 3,5% para Kp e 6% para Sa; — 6% para Kp e 8,5% para Sa). Histogramas (A), (B) e (C) resultados de cada fluorocromo para a *K. pneumoniae*; (D), (E) e (F) resultados de cada fluorocromo para a *S. aureus*

Os efeitos são menos visíveis nestes ensaios do que em suspensão possivelmente devido à forma de contacto das células bacterianas com o agente em estudo. Não é possível comparar estes resultados com a literatura pois não foi possível encontrar referencia a ensaios de citometria realizados com células bacterianas extraídas de amostras têxteis, sendo este método inovador.

Com estes resultados pode-se afirmar que o principal mecanismo de acção da L-Cys sobre ambas as bactérias, *K. pneumoniae* e *S. aureus*, reside na diminuição da actividade metabólica, mas também provoca alguma despolarização de membrana, resultados

compatíveis com a confirmação de que o efeito da L-Cys sobre esta bactéria é bacteriostático. De facto, alterações na actividade metabólica e despolarização de membrana são mecanismos que lesam as células bacterianas mas que podem ser reversíveis, não matando as células mas podendo causar danos permanentes que impedem o crescimento bacteriano.

## Capítulo 5

### Conclusão

O estudo realizado ao longo deste trabalho permitiu aprofundar e clarificar alguns conhecimentos relativos à actividade antibacteriana da L-Cisteína, tanto na sua forma livre como associada às fibras têxteis, em particular o algodão, e desenvolver um novo método para a obtenção de têxteis celulósicos com propriedades antibacterianas permanentes.

De acordo com os resultados obtidos nos ensaios antibacterianos, verificou-se que o acabamento de L-Cys aplicado ao algodão possui efeito bacteriostático contra ambas as estirpes em estudo, espécies seleccionadas de acordo com a normalização deste tipo de materiais, tem carácter permanente, isto é, a L-Cisteína fica fortemente ligada às fibras, e é obtido por um processo realizado em condições semelhantes a outros acabamentos têxteis. Isto é: funcionalizando a 80°C durante 60 minutos. Foi possível verificar, ainda, que a L-Cys na forma livre tem um efeito mais rápido, mas é necessária uma maior concentração do que quando aplicada ao têxtil. Tal variação pode ser justificada com a possível reactividade dos grupos sulfidrílo em solução e revela que a imobilização da L-Cisteína num têxtil potencia a sua actividade antibacteriana ao manter livres os grupos bioactivos que interagem com as células.

Neste trabalho foi ainda possível estabelecer, por citometria de fluxo, o mecanismo através do qual os grupos S ou SH induzem inibição do crescimento bacteriano. O principal mecanismo de acção da L-Cys contra a *K. pneumoniae* e a *S. aureus* reside na ocorrência de alterações na actividade metabólica destas bactérias, sendo também visível alguma despolarização de membrana. Esta elucidação do mecanismo de acção deste novo agente de funcionalização de materiais têxteis realizada em condições seguras e eficazes, reveste-se de grande importância científica porque contribui de forma inovadora e inequívoca para o conhecimento do modo como a L-Cisteína actua em bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, o que contribui para o avanço científico no que respeita à utilização de novas alternativas para o combate a agentes patogénicos que proliferam nos materiais em questão, mas também em outras aplicações.

Como a L-Cys se trata de um produto natural, torna o processo de obtenção de um material antimicrobiano vantajoso, pois não ocorre libertação de compostos citotóxicos para o ambiente nem para o ser humano - conforme comprovado em estudos anteriores a este - inclusive durante o seu manuseio, contribuindo assim para uma utilização segura e ecológica.

Desta forma, com este trabalho foi possível desenvolver um novo acabamento antibacteriano para fibras de algodão e celulósicas em geral, inequivocamente ecológico e não tóxico, contrariamente à maioria dos processos normalmente usados para o efeito, e compatível com outros acabamentos têxteis, o que permite a sua realização em equipamentos normalmente usados na indústria têxtil, tornando-o um novo método com forte probabilidade de aplicação industrial. Em simultâneo com a investigação aplicada, a investigação fundamental permitiu elucidar pela primeira vez o mecanismo de acção da L-Cisteína contra as bactérias *S. aureus* e *K. pneumoniae*.

## Capítulo 6

### Perspectivas Futuras

Todo o contacto directo com o desenvolvimento de novos acabamentos têxteis para funcionalização antibacteriana originou um enorme interesse, quer do ponto de vista científico quer do ponto de vista de aplicação industrial.

Desta forma, e na continuidade deste trabalho, pretende-se:

- testar a aplicação da L-Cisteína em outros materiais celulósicos de aplicação biomédica e hospitalar, nomeadamente o bambu e algumas viscoses, no sentido de otimizar as concentrações e condições de funcionalização no que diz respeito às condições de tempo e de temperatura;
- em consonância, e de modo a alargar o espectro de microrganismos para os quais a L-Cisteína tem potencial como agente antimicrobiano, pretende-se aprofundar os estudos na sua acção contra leveduras, dos quais já temos alguns resultados muito positivos contra *Candida albicans*, embora não tratados e apresentados nesta dissertação, já que requerem mais ensaios de validação;
- tendo em conta a novidade, eficácia e segurança deste novo processo, bem como o seu pedido provisório de patente, pretende-se também procurar potenciais parceiros industriais interessados neste novo processo e sua comercialização;
- face às conhecidas propriedades antioxidantes da L-Cisteína, pretende-se, ainda, testar essas propriedades e investigar a sua potencial aplicação em produtos de vestuário desportivo e cosmético.





# Capítulo 7

## Bibliografia

- Altman G.H., Diaz F., Jakuba C., Calabro T., Horan R.L., Chen J., Lu H., Richmond J., Kaplan D.L. (2003). Silk-based biomaterials. *Biomaterials* 23, 401-416
  
- Araújo M., Castro E. M. de Melo e (1984). Manual de Engenharia têxtil Volume I, Cap. 1, pag. 1-54, Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa
  
- Barrett C. T., Barrett J. (2001). Antibacterials: are the new entries enough to deal with the emerging resistance problems? *Current Opinion in Biotechnology*, 621-626
  
- Borkow G., Gabbay J. (2008). Biocidal textiles can help fight nosocomial infections. *Medical Hypotheses* 70, 990-994
  
- Bouhdid S., Abrini J., Zhiri A., Espuny M. J., Manresa, A. (2009). Investigation of functional and morphological changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Origanum compactum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1558-1568
  
- Bouhdid S., Abrini J., Amensour M., Zhiri A., Espuny M.J., Manresa A. (2010). Functional and ultra structural changes in *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* cells induced by *Cinnamomum verum* essential oil. *Journal of Applied Microbiology*, 1-11
  
- BS EN ISO 105-C06:1997 (*International Organization for Standardization*). Textiles - Test for colour fastness - Part C06: Colour fastness to domestic and commercial laundering
  
- BS EN ISO 13937-1:2000 (*International Organization for Standardization*). Textiles - Tear properties of fabrics - Part 1: Determination of tear force using ballistic pendulum method (Elmendorf)
  
- Canal C., Gaboriau F., Villegier S., Cvelbar U., Ricard A. (2009). Studies on antibacterial dressings obtained by fluorinated post-discharge plasma. *Pharmaceutical Technology* 367, 155-161

- **Chun D. T. W., Foulk J. A., Mcalister D. D. (2008).** Testing for antibacterial properties of cotton/flax denim 9, 371-376
  
- **Ciriano M.V., Korth H.G., Scheppingen W.B., Mulder P., 1999.** Thermal Stability of 2,2,6,6-Tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO) and Related N-Alkoxyamines. *Journal of the American Chemical Society* 121 (27), 6375-6381
  
- **Cloete T.E. (2003).** Resistance mechanisms of bacteria to antimicrobial compounds. *Applied and Environmental Microbiology* 51, 277-282
  
- **Cottell A., Denyer S.P., Hanlon G.W., Ochs D., Maillard J. (2009).** Triclosan-tolerant bacteria: changes in susceptibility to antibiotics. *Journal of Hospital Infection* 72(1), 71-76
  
- **Díaz M., Herrero M., García L.A., Quirós C. (2010).** Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses. *Biochemical Engineering Journal* 48, 385-407
  
- **Fukuzumi H., Saito T., Okita Y., Isogai A. (2010).** Thermal stabilization of TEMPO-oxidized cellulose. *Polymer Degradation and Stability* 95(9), 1502-1508. Elsevier Ltd
  
- **Gacén J.G., Gaurido J.M. (1987).** Algodon y Celulosa - Estructura y Propiedades. Universidad Politécnica de Barcelona - Terrassa, 1987
  
- **Gao Y., Cranston, R. (2008).** Recent Advances in Antimicrobial Treatments of Textiles, *Textile Research Journal* 78, 60-72
  
- **Giri V.R.D., Venugopal J., Sudha S., Deepika G., Ramakrishna S., (2009).** Dyeing and antimicrobial characteristics of chitosan treated wool fabrics with henna dye. *Carbohydrate Polymers* 75, 646-650
  
- **Gomes A.P., Mano J.F., Queiroz J.A., Gouveia I.C. (2010).** Assessment of bacteria-textile interactions using Scanning Electron Microscopy: A study on LbL chitosan/alginate coated cotton. *Microscopy: Science, Technology, Applications and Education* (1), 286-292
  
- **Gouveia I.C. (2010).** Nanobiotechnology: A new strategy to develop non-toxic antimicrobial textiles. *Applied Microbiology*, 407-414.
  
- **Gouveia I. C., Sá D., Henriques M. (2011).** Functionalization of Wool with L -Cysteine: Process Characterization and Assessment of Antimicrobial Activity and Cytotoxicity. *Polymer*, 1-7

- Gupta D., Khare S. K., Laha A. (2004). Antimicrobial properties of natural dyes against gram negative bacteria. *Coloration Technology*, 120:167-171
  
- Han S., Yang Y., (2005). Antimicrobial activity of wool fabric treated with curcumin. *Dyes and Pigments* 64, 157-161
  
- Hewitt C.J., Nebe-von-Caron G., 2001. An industrial application of multiparameter flow cytometry: Assessment of cell physiological state and its application to the study of microbial fermentations. *Cytometry* 44, 179-187
  
- Höfer D. (2006). Antimicrobial Textiles - Evaluation of Their Effectiveness and Safety. *Curr Probl Dermatol. Basel, Karger* 33(c), 42-50
  
- JIS L 1902:2002 (*Japanese Industrial Standard*). Testing for antibacterial activity and efficacy on textile products
  
- Joshi M., Ali S. W., Purwar R. (2009). Ecofriendly antimicrobial finishing of textiles using bioactive agents based on natural products. *Indian Journal of Fiber Textile Research* 34, 295-304
  
- Kangwansupamonkon W., Lauruengtana V., Surassmo S., Ruktanonchai U. (2009). Antibacterial effect of apatite-coated titanium dioxide for textiles applications. *Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine* 5(2), 240-249
  
- Kari C., Nagy Z., Kovács P., Hernádi F. (1971). Mechanism of the Growth Inhibitory Effect of Cysteine on *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology* 68, 349-356
  
- Kim Y.H., Nam C.W., Choi J.W., Jang J. (2003). Durable Antimicrobial Treatment of Cotton Fabrics Using Chloride and Polycarboxylic Acids. *Journal of Applied Polymer* 88 (6), 1567-1572
  
- Lewin M., Pearce E. M. (1998). Handbook of fiber chemistry, 2ª edição, cap. 6 e 9, pag. 416-456 e 579-705, Marcel Dekker Inc, New York
  
- Luna-Bárcenas G., Gonzalez-Campos B., Elizalde-Peña E.A., Vivaldo-Lima E., Louvier-Hernández J.F., Vorobiev Y.V., González-Hernández J. (2008). FEMO modelling of optical properties of natural biopolymers chitin and chitosan. *Physica Status Solidi (c) - Current Topics In Solid State Physics* 12, 3736-3739

- **M7-A6 (Vol.23 No.2).** Metodologia dos testes de sensibilidade a agentes antimicrobianos por diluição para bactérias de crescimento aeróbio, 6ª edição
  
- **Ma M., Sun G. (2005).** Antimicrobial cationic dyes 3: simultaneous dyeing and antimicrobial finishing of acrylic fibers. *Dyes and pigments* 66, 33-40
  
- **Maillard J.Y. (2002).** Bacterial target sites for biocide action. *Journal of Applied Microbiology Symposium Supplement* 92, 16-27
  
- **Michielsen S. (2004).** Approaches to Controlling Micro-organisms in Hospital Textiles 4th International Conference on Safety and Protective Fabrics. IFAI event, 132-150
  
- **Midgley M., 1987.** An efflux system for cationic dyes and related compounds in *E.coli*. *Microbiol. Sci.* 4, 125-12
  
- **Moellering Jr R. C. M. (2011).** Discovering new antimicrobial agents. *International Journal of Antimicrobial Agents* 37(1), 2-9
  
- **Morris S.L., Walsh R.C., Hansenq J.N. (1984).** Identification and Characterization of Some Bacterial Membrane Sulfhydryl Groups Which Are Targets of Bacteriostatic and Antibiotic. *Journal of Biological Chemistry* 259(21), 13590-13594
  
- **Murray P.R., Rosenthal K.S., Pfaller M.A. (2008).** *Medical Microbiology* 5ª edição, cap. 22 e 31, Elsevier Mosby, Filadélfia
  
- **Nebe-von-Caron G., Badley R.A., 1995.** Viability assessment of bacteria in mixed populations using flow cytometry. *J. Microsc.* 179, 55-66
  
- **Nebe-von-Caron G., Stephens P.J., Hewitt C.J., Powell J.R., Badley R.A., 2000.** Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting. *J. Microbiol. Methods* 42, 97-114
  
- **Nelson D.L., Cox M.M. (2008).** *Lehninger: Principles of Biochemistry*, 5ª edição, cap. 22, pag. 860-894, W H. Freeman and Company, New York
  
- **Porter J., Deere D., Pickup R., Edwards C., 1996.** Fluorescent Probes and Flow Cytometry: New Insights Into Environmental Bacteriology. *Cytometry* 23, 91-96
  
- **Prescott, Harley, Klein (2008).** *Microbiology* 7ª Edição, Mc Graw-Hill, New York

- **Protocolo *Ellman's Reagent*, 2011.** Thermo Fisher Scientific Inc. - Pierce Biotechnology, USA
- **Purwar R., Joshi M. (2004).** Recent developments in antimicrobial finishing of textiles - A review. *AATCC Review* 3, 22-26
- **Raafat D., Borgen K., Haas A., Sahl H.G. (2008).** Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound, *Applied and Environmental Microbiology* 74, 3764-3773
- **Rabea E.I., Badawy M.E.I., Steurbaut W., Stevens C.V. (2009).** In vitro assessment of N-(benzyl)chitosan derivatives against some plant pathogenic bacteria and fungi. *European Polymer Journal* 45, 237-245
- **Ramachandran T., Rajendrakumar K., Rajendran R. (2004).** Antimicrobial Textiles - an Overview. *IE (I) Journal-TX* 84, 42-47
- **Raschle P. (1989).** Microbial Influence on Cellulosic Textiles and Microbiological Testing. *International Biodeterioration* 25, 237-244
- **Ren X., Hasan B. Kocer, S.D. Worley, R.M. Broughton, T.S. Huang (2009).** Rechargeable biocidal cellulose: Synthesis and application of 3-(2,3-dihydroxypropyl)-5,5-dimethylimidazolidine-2,4-dione. *Carbohydrate Polymer* 75, 683-687
- **Rieseberg M., Kasper C., Reardon K.F., Scheper T. (2001).** Flow cytometry in biotechnology. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 56, 350-260
- **Ristić T., Zemljič L. F., Novak M., Kunčič M. K., Sonjak S., Cimerman G., et al (2011).** Antimicrobial efficiency of functionalized cellulose fibres as potential medical textiles. *Health Care*, 36-51
- **Sá D. (2009).** Desenvolvimento de um novo tratamento anti-bacteriano para bio-funcionalização de materiais à base de lã. Dissertação de Mestrado em Bioquímica - Universidade da Beira Interior
- **Schindler W. D., Hauser P. J. (2005).** Chemical Finishing of Textiles, *The Textile Institute*, Woodhead Publishing Ltd, CRC, cap 15, p165-174
- **Schmidt H., Naumann M., Muller T. S., Akarsu M. (2005).** Application of spray techniques for new photocatalytic gradient coatings on plastics. *Thin Solid Films* 502, 132-7

- Shieh K.J., Li M., Lee Y.H., Sheu S.D., Liu Y.T., Wang Y.C. (2006). Antibacterial performance of photocatalyst thin film fabricated by defection effect in visible light, *Nanomedicine* 2, 121-6
  
- Silva F., Lourenço O., Pina-Vaz C., Rodrigues A.G., Queiroz J.A., Domingues, F.C. (2010). The use of DRAQ5 to monitor intracellular DNA in *Escherichia coli* by Flow Cytometry. *Journal of Fluorescence*, 907-914
  
- Silva F., Ferreira S., Queiroz J.A., Domingues F.C. (2011). Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil: its antibacterial activity and mode of action evaluated by flow cytometry. *Journal of Medical Microbiology*, 1479-1486
  
- Silva T.L., Reis A., Hewitt C., Roseiro J.C. (2003). Citometria de fluxo - Funcionalidade celular on-line em bioprocessos. *Boletim de Biotecnologia* 2003, 1: 32-40
  
- Silver L., Bostian K. (1990). Screening of Natural Products for Antimicrobial Agents. *New York* 7, 455-461
  
- Silver S., Phung T., Silver G. (2206). Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnology*, 33: 627-634
  
- Singh R., Jain A., Panwar S., Gupta D., Khare S. K. (2005). Antimicrobial activity of some natural dyes. *Dyes and Pigments* 66, 99-102
  
- Sun G., Xu X., Bickett J.R., Williams J.F. (2001). Durable and Regenerable Antibacterial Finishing of Fabrics with a New Hydantoin Derivative. *Industrial and Engineering Chemistry Research* 40, 1016-1021
  
- Sun Y.A., Sun G. (2002). Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activities of Novel N-Halamine Polymer Beads Prepared by Suspension Copolymerization. *Macromolecules* 35, 8909-8912
  
- Tenover F.C. (2006). Mechanisms of Antimicrobial Resistance in Bacteria. *The American Journal of Medicine* 119, S3-S10
  
- Tomšić B., Barbara Simončič, Boris Orel, Metka Zěrjav, Hans Schroers, Andrej Simončič, Zoran Samardžija (2009). Antimicrobial activity of AgCl embedded in a silica matrix on cotton fabric. *Carbohydrate Polymers* 75, 618-626

- **Willer H., Kilcher L. (Eds.) (2009).** The World of Organic Agriculture. Statistics and Emerging Trends 2009, IFOAM, Bonn, and FiBL, Frick
- **Williams J.F., Cho U. (2005).** Antimicrobial functions for synthetic fibers: recent developments. American Association of Textile Chemists and Colorists, AATCC Review 5 (4), 17-21
- **Xu J.H., Li S.W., Tostado C., Lan W.J., Luo G.S. (2009).** Preparation of monodispersed chitosan microspheres and in situ encapsulation of BSA in a co-axial microfluidic device. Biomedical Microdevices 11, 243-249
- **Yadav A., Prasad V., Kathe A.A., Raj S., Yadav D., Sundaramoorthy C., Vingneshwaran (2006).** Functional finishing in cotton fabrics using zinc oxide nanoparticles, Bull Mater Sci, 29, 641-645
- **Zhang, Y.Q. (2002).** Applications of natural silk protein sericin in biomaterials. Biotechnology Advances 20, 91-100

